# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 28/2/2013 (1)

---

**Medicina di laboratorio, 28/02/13**

**Sbobinatore:Anna Borghesani**

**Revisore:Tommaso Ioris**

Nel corso verranno trattati argomenti di **ematologia di laboratorio.**

L'ematologia di laboratorio viene condotta con strumenti e tecniche che portano all' osservazione macroscopica e tissutale delle cellule del sangue. Uno dei più antichi sistemi di osservazione delle cellule del sangue, ma ancora oggi attuale, parte dalla preparazione del **vetrino microscopico**. Tale preparazione viene mostrata in un filmato (proiettato a lezione), che si può trovare in rete facilmente, anche su youtube.

*Il professore commenta il **filmato di preparazione del vetrino***:

1)Una goccia di sangue viene posta su un vetrino e con un altro vetrino la si tira e poi si striscia per distribuirla uniformemente

2)Dopo che il vetrino si è asciugato, lo si fissa con Etanolo

3)Si lascia asciugare

4) Il vetrino viene messo su un supporto e si mette il primo colorante (v. Più avanti), che è sciolto in alcol metilico e lo si lascia per 2min. E' un colorante molto forte quindi usare i guanti.

5) Dopo 2 min il colorante viene diluito con acqua distillata.

6) Il vetrino viene lavato con acqua corrente di rubinetto, finchè il colore non diventa rosa.

7) viene quindi coperto con una soluzione, che è il vero colorante (è una colorazione piuttosto rapida).

8) il vetrino viene poi lavato sotto acqua corrente.

9) si fa l' ultimo lavaggio in una soluzione <u>debolmente</u> acida (deve risultarne un colore meglio visibile).

10) si lascia asciugare

A questo punto il vetrino sarebbe pronto, tuttavia alcuni fanno il cosiddetto "montaggio del vetrino", usando il balsamo e un vetrino copri oggetto, ma non è necessario, si può anche osservare senza questa fase finale.

Ci sono delle **varianti** importanti da notare in questo procedimento:

- il primo colorante in Europa viene chiamato May-grunwald (parola tedesca). Wright invece è il colorante che viene usato maggiormente negli U.S.A., ma praticamente sono la stessa cosa.

- Il secondo colorante si chiama Giemsa, può essere usato da solo per 1 min. oppure diluito al 5% per 20 min. ( in pratica è la stessa cosa, si diluisce 1/20 2 si lascia agire 20 min invece che da solo 1 min). In genere lo si fa più diluito perchè si ritiene che la resa della colorazione sia migliore. Però se si ha fretta lo si può usare anche non diluito.

La tecnica dello **striscio**:

- si mette la piccola goccia di sangue sul vetrino

- poi a un' estremità di un vetrino (circa ai ¾), con un altro vetrino identico si torna indietro fino a toccare la goccia con l' angolo che viene a crearsi coi due vetrini

- si lascia che il sangue si distribuisca lungo il bordo dell' angolo

- quindi si porta avanti rapidamente il vetrino in modo che il sangue si distribuisca uniformemente. (Ci vuole un po' di mano per saper creare un buon vetrino, e sarebbe utile saperlo fare in alcune situazioni di volontariato in certi paesi in via di sviluppo con minori attrezzature)

*Il professore mostra alcune immagini di preparati istologici per capire quali siano le cose importanti nella loro preparazione*

L'angolatura che viene a crearsi tra i due vetrini è importante nel determinare lo **spessore** dello striscio. Ovvero come sono disposte le cellule nel momento in cui vado a osservare il vetrino.

*Il professore mostra l'immagine di un vetrino con globuli rossi, bianchi e piastrine*.

Se il vetrino ha un corretto spessore, le cellule devono apparire sufficientemente distanziate, non sovrapposte, con una forma simile a quella che avrebbero se osservate in vivo. Infatti (in questo preparato) i globuli rossi appaiono con la tipica forma a disco biconcavo, con la parte centrale sottile più chiara e quella periferica spessa più scura. Il colore in questo caso è dato dall' Hb, nel globulo bianco invece l'effetto è dato dalla colorazione, in quanto in vivo non è colorato mentre il globulo rosso è veramente rosso mattone. Si può notare il nucleo e il citoplasma del globulo bianco, che in questo caso è un granulocita neutrofilo. Questo è quindi un vetrino dallo spessore corretto, in quanto è possibile vedere i due spessori del globulo rosso (2,6 micron ai bordi, meno di 1 micron al centro e un diametro medio di 7,7-7,8micron).

Ogni eritrocita contiene circa 250milioni di molecole di Hb.

Ora vediamo un altro vetrino meno “bello” del precedente, con qualche sovrapposizione, ma nel complesso le cellule sono distinguibili. Si può notare un neutrofilo, un monocita e anche eritrociti

Ora vediamo un vetrino troppo sottile. Infatti i globuli rossi appaiono come se fossero adattati nei margini (come piastrelle). Inoltre manca la distinzione tra la periferia e il centro del globulo rosso, come se fossero stati schiacciati. Perciò questo vetrino non va bene per l'osservazione morfologica. Tale vetrino è risultato troppo sottile a causa dell' angolo troppo <u>acuto</u> tra i due vetrini.

Nel caso contrario, ovvero quando lo striscio è stato effettuato con un angolo più ottuso(verso l'angolo retto), otterrò un preparato troppo spesso. I globuli rossi risultano ammassati e la morfologia dei globuli bianchi non è corretta. È quindi un vetrino che non va bene per l'osservazione morfologica.

Parliamo di **microscopio:**

E' uno strumento per ingrandire. Il tipo di ingrandimento dipende da ciò che si deve osservare. Ad esempio gli istologi usano un ingrandimento inferiore rispetto a coloro che devono osservare vetrini citologici, come gli strisci di globuli rossi.

La differenza tra obiettivo e oculare: l'oculare è un gruppo di lenti, da cui si osserva direttamente con l'occhio e in genere ha un ingrandimento fisso di 10X. Gli obiettivi variano e sono posti in revolver, che contengono una serie di obiettivi (4 o 5), che vanno da 4X fino a 100X, con gradazioni intermedie di 15X, 20X o 25X e 40X.

In genere per le osservazioni <u>istologiche</u> si impiegano ingrandimenti che vanno da 4 a 40X (si intende di obiettivo). Per le osservazioni <u>citologiche</u> si va dal 40 al 100X.

L'ingrandimento finale del microscopico si ottiene moltiplicando il potere d' ingrandimento dell' oculare con quello dell'obiettivo.

Ad esempio: 10X oculare x 40X obiettivo= 400X.

L'oggetto sarà ingrandito 400 volte rispetto all'originale. L'ingrandimento 100X generalmente non viene usato "a secco" (ovvero con aria tra obiettivo e vetrino), ma si usa un mezzo intermedio, detto olio per microscopia, che permette la creazione di un obiettivo "ad immersione". Gli obiettivi 100X sono tutti ad immersione, e serve a correggere il problema della diffrazione della luce. Infatti più si aumenta l' ingrandimento e più aumentano i fenomeni di diffrazione, che ad un ingrandimento 100X divengono poco tollerabili per una buona visione. Perciò utilizzando questo olio, che ha lo stesso indice di diffrazione del vetro/cristallo ottico, non si ha un passaggio di mezzo (vetro-aria-vetro). Infatti la luce viaggia a 300km/s nel vuoto, ma quando passa attraverso un mezzo subisce un rallentamento, che corrisponde alla diffrazione. Questo fenomeno provoca anche una scomposizione della luce, perciò è importante utilizzare l'olio, che fa sì che la luce passi sempre come attraverso il vetro e non subisca quindi modifiche nella velocità.

Oltre a queste componenti per l'osservazione, un microscopio possiede anche un tavolino, su cui si pone il preparato e sotto il tavolino un sistema di condensatore della luce. Lo scopo del condensatore è quello di concentrare il fascio di luce, proveniente dalla lampadina, sul preparato per fornirgli la massima intensità della luce. In genere la luce che arriva al preparato è bianca. La luce bianca è composta da varie componenti cromatiche, che al momento dell'osservazione possono portare a diversità. Per eliminare queste differenze, per la percezione chiara del preparato, si usano dei filtri colorati (blu) con la funzione di eliminare la componente rossa della luce, che è quella che causa la maggior parte della distorsione dell'immagine. In questo modo si seleziona una lunghezza d'onda che è più verso il blu, senza essere del tutto blu, altrimenti si perderebbe la visione dei colori. E' importante mettere a fuoco bene l'immagine, regolando il microscopio con le apposite viti. Il condensatore inoltre possiede un diaframma, che permette di regolare l'intensità della luce.

*Il professore mostra poi un'immagine di batteri in cui il fenomeno della diffrazione viene eliminato grazie alla tecnica dell' immersione ad olio.*

L'olio va posto sul vetrino poi si pone in contatto la lente dell' obiettivo 100X con l'olio e bisogna stare attenti alla focalizzazione, che è molto delicata e si corre il rischio di rompere il vetro (che è costoso).

Dopo aver fatto questo excursus sulla microscopia, torniamo a parlare di **globuli rossi**.

I globuli rossi nascono nel midollo osseo. Si trovano nel sangue dove trascorrono la loro vita (di 100- 120 gg). Vengono distrutti nella milza, nel sistema reticolo-istocitario, quando sono vecchi. Per essere riconosciuti come vecchi, i globuli rossi vengono stressati dalla milza, dove non passano sempre, ma circa 1 volta ogni 15. Il meccanismo di stress viene attuato poichè la milza risulta un ambiente ostile, in quanto vi è poco glucosio e ossigeno. Quindi se un globulo rosso è sano possiede al suo interno gli enzimi necessari alla sua sopravvivenza anche in questo ambiente sfavorevole, mentre il globulo rosso vecchio non dispone di sufficienti capacità metaboliche e quindi si trova in grande difficoltà. In tale momento di difficoltà avviene l'esposizione sulla superficie dell' eritrocita di una proteina citoplasmatica, attraverso un meccanismo di "flip- flop", che lo rende riconoscibile da parte del sistema reticolo-istocitario che quindi lo elimina. A questo punto fuoriesce l'emoglobina, viene liberato il ferro (molto importante per l'organismo e quindi subito recuperato) e il resto viene degradato. L'eme diviene protoporfirina, poi subito trasformata in bilirubina, che viene legata all'albumina e portata al fegato. In questa sede viene eliminata e ed è utilizzata nell' intestino come sostanza tensioattiva per l'assorbimento dei grassi. Nell'intestino, tuttavia, la bilirubina può anche essere metabolizzata dai batteri intestinali, che la trasformano in urobilinogeno. Questo composto è idrosolubile perciò viene riassorbito, passa nel sangue e viene escreto dal rene con l'urina, alla quale conferisce il caratteristico colore giallino. Questo circolo entero-epatico (o urinario-entero-epatico), se viene interrotto in qualche parte, soprattutto nel passaggio da fegato a intestino, è segnale di una patologia di tale circolo.

Parliamo ora dei **precursori nel midollo**.

Si parte da cellule staminali che sono presenti nel midollo, che possono essere totipotenti, oppure indirizzate verso la linea mieloide o eritroide. Si passa quindi a una cellula già orientata: il **proeritroblasto**. Questa è una cellula di grandi dimensioni, con evidenti nucleoli, con un citoplasma molto basofilo (che significa molto rna e quindi molta sintesi proteica). La fase successiva è quella di eritroblasto basofilo. Una cellula in cui il nucleo inizia a condensarsi (fase precoce di una successiva picnosi nucleare con compattamento della cromatina) e con citoplasma basofilo. Si passa poi a **eritroblasto policromatofilo**, in cui inizia a evidenziarsi la formazione dell' hb, perchè oltre alla basofilia tipica per la presenza di rna vi è anche l'inizio di un'acidofilia causata dall' hb. Il nucleo continua a rimpicciolirsi, fino ad arrivare all'**eritroblasto ortocromatofilo**. In questo stadio il nucleo è in fase di pre-espulsione. Nello stadio successivo di **reticolocita** il nucleo è espulso. Questa cellula è molto importante anche per le diagnosi di laboratorio. Il reticolocita ha le caratteristiche delle cellule mieloidi da un lato e mature dall'altro: ha hb e manca di nucleo (come globulo rosso) ma contiene ancora poliribosomi e quindi è in grado di sintetizzare ancora hb, possiede recettori per la transferrina e quindi la capacità di incorporare ferro e una sopravvivenza limitata sotto forma di questa cellula. Il reticolocita ha una vita di 3 giorni, dopo di che diviene eritrocita maturo. Normalmente passa i primi 2 giorni nel midollo e l'ultimo nel sangue circolante,

però questa durata e la sua presenza in circolo in base al suo giorno di vita dipendono dalle condizioni in cui si trova il midollo. Se il midollo è in condizioni di anemia per cui il corpo richiede tramite epo (eritropoietina) la produzione di globuli rossi, il midollo risparmierà sulla fase maturativa e il reticolocita verrà mandato nel sangue in una fase precoce. In questo modo noi osserviamo un aumento di reticolociti in circolo durante una forte anemia. Questo aumento di eritrociti è favorito nelle anemie in cui si instauri una terapia. Ad esempio in caso di anemia dovuta ad un deficit di VitB12, al momento della somministrazione di tale vitamina si osserverà un aumento dei reticolociti. Lo stesso vale per le anemie da deficit di ferro e sua conseguente somministrazione. Inoltre il reticolocita viene usato come indice del successo di un trapianto di midollo. La conta dei reticolociti è passata dall' utilizzo di sistemi basati sulla microscopia a sistemi molto più recenti basati su una valutazione citologica a flusso con particolari marcatori che permettono di misurare il numero ma anche lo stadio di maturazione (2 indici molto importanti). Nelle varie fasi di maturazione si assiste ad una progressiva diminuzione delle dimensioni.

Il reticolocita è relativamente macrocitico rispetto all'eritrocita. L'eritrocita ha volume medio di 85-90 fenton litri (o micron cubici), mentre il reticolocita è sopra ai 100 fentonlitri. La condizione di macrocitosi, in assenza di deficit di Vit B12 o folati, è indicativa di una popolazione relativamente più giovane di eritrociti. Infatti un eritrocita maturo è più piccolo di uno più giovane in quanto nel corso della sua vita tende a perdere acqua.

*Il professore indica varie cellule in un'immagine*: proeritroblasto, plasmacellula, globuli rossi normali.

Osservazioni sui **globuli rossi normali**: esistono differenze di diametro tra l'uno e l'altro (da cui posso dedurre il volume). Dai valori precedentemente indicati di 85-90 fenton litri si può arrivare ad una variabilità che va da 82 a 95 fenton litri, pur restando nella normalità in quanto è presente una piccola quota di globuli rossi che si avvicinano agli 82 fenton litri, la maggioranza che si trova compresa tra 85 e 90 fenton litri, e una piccola quota intorno al valore di 95 fenton litri. Questo indica che la popolazione dei globuli rossi si comporta come tutte le popolazioni seguendo la regola statistica di distribuzione normale, per cui c'è una variabilità di dimensioni che può essere misurata ed espressa in termini di media e deviazione standard. Questo è uno dei sistemi che permette di classificare le anemie: normocitiche, macrocitiche, microcitiche, a seconda del volume medio degli eritrociti. Infatti la deviazione standard è un indice di dispersione dei valori. Più è ampia e più sono dispersi i valori. Una grande dispersione dei volumi dei globuli rossi in termini tecnici viene detta anisocitosi (dal greco : i volumi non sono uguali tra loro). Inoltre nello striscio si possono vedere anche i globuli bianchi, e quelli presenti nell'immagine sono 2 dei 5 tipi di globuli bianchi: granulocita neutrofilo (caratterizzato dalla presenza di nucleo lobato) e linfocita (con un solo nucleo e piccolo citoplasma). Inoltre si può notare nell'immagine uno schistocita, un frammento di globulo rosso, che dipende dal fatto che in un campione di sangue ci sono tutti i diversi stadi della vita in circolo del globulo rosso e questo è uno arrivato al termine della propria vita e che probabilmente al prossimo passaggio attraverso la milza verrà eliminato. Però potrebbe anche derivare da un evento casuale (es. trauma) che causa la rottura anche dei globuli rossi. Infatti gli schistociti sono molto aumentati per alcune ore in atleti che compiono sforzi prolungati, come la maratona, per la continua compressione dei piedi, che causa un microtraumatismo dei capillari. Alcuni di questi atleti hanno una carenza di ferro dovuta ad una eritropoiesi accelerata per questo motivo.

Passiamo ad analizzare il **midollo osseo**. Il rapporto tra cellule bianche e rosse deve tener conto del numero e del turnover. I globuli rossi vivono 120gg, i globuli bianchi variano da una vita più lunga per i linfociti ad una più breve per i granulociti (qualche ora), che nel sangue sono solo di passaggio perchè vanno in periferia essendo la prima linea di difesa. Nel midollo ci sono lacune, dovute al grasso che le riempie e che viene perso durante la preparazione del vetrino. Nel resto del preparato vi sono cellule. Ci sono zone con cellule più chiare e altre con cellule più scure, l'osservazione di queste caratteristiche permette di capire se il midollo ha un normale rapporto di produzione. Le zone chiare rappresentano la sede di produzione dei globuli bianchi, mentre quelle scure quelle dei globuli rossi. Il rapporto è invertito nel midollo rispetto al sangue, infatti i precursori dei globuli bianchi sono di più rispetto a quelli dei globuli rossi, proprio per la breve emivita dei globuli bianchi nel sangue.

Sono presenti anche precursori delle piastrine: grandi cellule con nucleo suddiviso.

L' <u>aspirato</u> del midollo si conduce a livello del manubrio dello sterno, mentre la <u>biopsia</u> (richiesta soprattutto dagli ematologi) viene condotta a livello della cresta iliaca, con una tecnica che permette di ottenere tessuti che mantengono l'aspetto trabecolare, che viene invece perso con l'aspirato. Quindi nella biopsia si osserva meglio l'aspetto organizzato del midollo.

Passiamo ora alla **valutazione laboratoristica tramite sistemi di conta delle cellule del sangue**.

Anni fa veniva condotta al microscopio (lenta e con imprecisione del 20%). Ora si conducono in modo automatizzato nel giro di 1minuto con una accuratezza e precisione inferiore al 2-3%. esistono anche sistemi miniaturizzati. Il principio generale per il conteggio si basa su 2 modalità:

1) quella basata sull' <u>impedenzometria</u> : principio elettrometrico

2) quella basata sull' <u>optometria</u> : principio ottico

Il principio ottico sta prendendo piede su quello elettrometrico, anche se gli apparecchi più recenti cercano di combinare i vantaggi di entrambi i metodi.

**1) impedenzometria**

- Il campione di sangue viene diluito in un liquido isotonico (soluzione fisiologica)

- Una pompa spinge i globuli rossi in una certa direzione e un particolare metodo idraulico li allinea uno di seguito all'altro. Questo è un percorso velocissimo perchè in 1 minuto passano circa 300.000 globuli rossi

- Poi i globuli rossi passano attraverso un orifizio con diametro di 100micron

- Due tubi di metallo conduttore creano una differenza di potenziale. In assenza di globuli rossi che passano, la soluzione isotonica porta normalmente la corrente che si instaura tra i due elettrodi. Nel momento in cui passano gli eritrociti, ognuno di essi, essendo un sistema dielettrico che impedisce il passaggio di corrente attraverso se stesso,provoca una lieve e transitoria diminuzione della corrente, che viene rilevata e amplificata da un sistema di misura, che segnala quindi il passaggio della cellula

- Ogni cellula dà un segnale e tanto più grande è la cellula, quanto sarà maggiore l' intensità del segnale. Quindi in 1 minuto avrò circa 300.000 segnali, che sono raccolti da un sistema computerizzato e nel giro di pochi secondi rielaborati come grafico.

**2) optometria**

E' più sofisticato perchè si basa sulla luce laser e sulle caratteristiche che hanno le particelle quando sono attraversate da un fascio di luce. Le particelle generano 2 principali modalità di segnale, quando attraversate dalla luce, perchè la particella ha un indice di diffrazione diverso dal mezzo nel quale è immersa, e quindi distorce la luce secondo 2 angoli: angolo forward (molto acuto) e un angolo molto ampio. Quindi raccogliendo la luce opportunamente è possibile risalire al numero delle cellule, dimensione e dimensione del nucleo(qualora lo possieda).

*Il professore mostra un' immagine con molti puntini*, ognuno dei quali rappresenta una cellula. Si possono trovare: piastrine (1-10 fenton litri), frammenti di cellule, globuli rossi, linfociti, monociti, granulociti. Questi sistemi hanno quindi una grandissima sensibilità. Queste informazioni vengono tradotte in grafici.

Le cellule della serie bianca vengono classificate anche nelle loro diverse classi.

L'ematocrito consiste nella quantità di parte corpuscolata del sangue rispetto al totale del sangue e in questo caso viene espressa in percentuale (47%). L' ematocrito, che in realtà dovrebbe tenere conto solo della serie rossa, viene calcolato moltiplicando la somma dei singoli volumi degli eritrociti per il loro numero.

Si ha poi l' MCV (*mean cell volume,* volume cellulare medio), espresso in fenton litri o micron cubici.

Abbiamo poi MCH (*mean cell hemoglobin,* contenuto in emoglobina cellulare medio), ovvero quanta hb contiene ogni cellula in picogrammi. Per calcolarlo si divide l'emoglobina per il numero delle cellule.

Poi MCHC (*mean cell hemoglobin concentration,* concentrazione di hb media per ciascuna cellula in percentuale), ad esempio il 34% del globulo rosso è costituito da hb.

Noi sappiamo che generalmente 1/3 dell'eritrocita è costituito da hb,  e per il resto da acqua e da altre poche proteine.

Poi RDW (*Red Cell Distribution Width*, ampiezza di distribuzione della popolazione eritrocitaria), variabilità o deviazione standard in percentuale della grandezza dei globuli rossi. In questo esempio è 12.5% (valore nella norma). Un valore è definito normale quando compreso tra 12% e 16%. Al di sopra del 16% si considera anisocitosi, ed è sempre indice di un malfunzionamento midollare (il midollo non riesce a controllare bene la "qualità" nella produzione dei globuli rossi). Non ci sono problemi scendendo al di sotto dei valori paradigmatici, l'importante è non superarli (andare al di sopra).

Se l'MCV è molto alto esprime macrocitosi, se molto basso microcitosi.

A questo si accompagna anche l'MCH, perchè c'è un rapporto abbastanza stretto tra massa di un eritrocita e il suo contenuto in hb (circa 1/3 della massa).

Sono poi indicate le piastine, 179/gigalitro. (179.000/microlitro)

MPV, che è l'equivalente dell' MCV per le piastrine, ovvero volume medio delle piastrine.

Si può vedere anche un grafico, che viene fornito da questi apparecchi, che suddivide le cellule nelle varie popolazioni.

Ora vediamo un tipo di anemia, **anemia microcitica ipocromica**, la più frequente.

I globuli rossi sono molto piccoli e poco colorati, perchè hanno hb solo in una piccola parte periferica. Questa situazione non interessa tutte le cellule, ma solo una parte. A questo tipo di anemia si possono accompagnare aspetti di cellule irregolari dal punto di vista morfologico. Perchè trovandosi il midollo in una condizione di stress (perchè stimolato dall'epo del rene a produrre eritrociti vista la carenza), viene rallentato il controllo sulla produzione di eritrociti e quindi possono essere messi in circolo eritrociti deformati, che normalmente sarebbero invece eliminati. Però la necessità di ossigeno da parte dell' organismo è talmente elevata, che si tollera questa

irregolarità. Questi elementi deformati vengono distrutti quando arrivano alla milza, questo aggrava l'anemia.

Inoltre è interessante notare che la spinta eritropoietica, si traduce anche in una spinta sulla produzione delle piastrine. I megacariociti sono sensibili all'epo e producono piastrine giganti e con granuli raggruppati che possono somigliare a un nucleo.

In questo tipo di anemia si osserva anche poichilocitosi ovvero cellule con forme molto diverse da quelle normali.

Il midollo di un soggetto sideropenico viene ad essere tanto stimolato da risultare molto scuro ("midollo scuro"). Infatti la componente della serie rossa è aumentata rispetto a quella della serie bianca.

Il test che viene ancora considerato di riferimento per la valutazione della mancanza di ferro in un soggetto consiste nella valutazione dei siderociti (cellule che contengono ferro) nel midollo. Nei soggetti normali i siderociti, colorati con particolare colorazione, hanno granulazioni blu-nere al loro interno. In soggetti con questo tipo di anemia non si vedranno le granulazioni.

In soggetti sideroblastici (eccesso di ferro), il midollo colorato con Blu di Prussia ha grossolane granulazioni.

I reticolociti possono essere visualizzati microscopicamente con Blu brillante di Creside, mescolandolo per 10 min con il sangue e conducendo poi uno striscio. Con l'osservazione 100X si nota la colorazione verdastra dei poliribosomi presenti ancora nei reticolociti.

È importante che la conta dei reticolociti sia corretta per l'ematocrito del paziente. L'ematocrito del paziente in percentuale per conta dei reticolociti in percentuale, diviso 45 (che è l' ematocrito medio di un individuo normale), mi dà la conta corretta. Ad esempio un anemico con ematocrito di 19% e con 1% di reticolociti (che sarebbe un valore normale per una persona normale), in realtà ha un basso numero di reticolociti se rapportati all' ematocrito.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 7/3/2013 (1)

---

### Lezione di Metodologia Clinica

7/3/2013

Sbobinatrice: Lucrezia Caoduro

## Le Anemie

La classificazione delle anemie secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità è una classificazione media, che non deve essere presa come assoluta, riguarda in generale tutte le popolazioni. In alcuni casi questi valori possono essere ritenuti troppo bassi. Per esempio: nelle nostre zone dire che un maschio con valori di emoglobina (Hb) inferiori a 130 g/l è in una condizione anemica e una femmina con valori inferiori a 120 g/l è in una condizione anemica e può rientrare già in una classificazione troppo avanzata. Nelle nostre zone infatti il livello viene fissato con 5 g di più (135 g/l per i maschi e 125 g/l per le femmine). E' una classificazione che quindi tiene conto della popolazione media mondiale.

La classificazione delle anemie è principalmente basata sui valori di Hb e poi sull'ematocrito (Ht), che rappresenta la quota di globuli rossi rispetto all'unità di volume di sangue che è costituita dalla parte cellulare, corpuscolata. L'Ht è espresso o in l/l, cioè equiparando il volume (V) delle cellule all'unità di V Litro oppure in %. Comunque le unità internazionali per Hb sono i g/l, mentre per Ht sono i l/l; nonostante questo le unità tradizionali sono ancora molto in uso per esempio: g/dl oppure il %.

Nel momento in cui si accerti che una persona sia anemica, una classificazione dell'anemia viene fatta in base al V dei globuli rossi, che rappresenta una quantità facilmente misurabile con strumentazione ed è distinta in tre condizioni:

- Anemie Microcitiche: hanno un V dei globuli rossi ridotto rispetto a un valore che viene ritenuto di normalità;
- Anemie Normocitiche: il V dei globuli rossi è mantenuto, normale;
- Anemie Macrocitiche: il V dei globuli rossi è aumentato.

Queste tre condizioni identificano gruppi di anemie che hanno caratteristiche differenti tra loro, ma alcuni tipi di anemie possono comparire anche con caratteristiche comuni a un gruppo e all'altro.

## Anemie microcitiche

Nella classificazione sono presenti:

Anemie Generalmente Microcitiche

1. Anemia Sideropenica: è acquisita e dovuta a uno stato carenziale alimentare, per la mancata introduzione del Ferro (Fe) con la dieta. Interessa la componente dell'Hb legata all'eme;
2. Anemia Talassemica: ha una base genetica, è dovuta ad alterazione dei geni che esprimono la componente proteica dell'Hb;
3. Anemia delle Sideroblastosi: condizione più rara, si ritrova in condizioni preleucemiche (quando ci sono alterazioni che preludono alla leucemia) e comporta una incapacità da parte di queste cellule di utilizzare il Fe. Queste anemie legate ad alterazioni che interessano la molecola dell'eme; le Sideroblastosi possono avere caratteristiche ereditarie.

Anemie Occasionalmente Microcitiche

1. Condizioni croniche: stati infettivo-infiammatori, specie se sono prolungati nel tempo, portano a una incapacità dell'organismo di utilizzare il Fe pur essendo il Fe presente nell'organismo. Questo differenzia questo tipo di anemia dall'Anemia Sideropenica: nella prima il Fe è presente ma non viene utilizzato, nella seconda vi è carenza di Fe.
2. Emoglobinopatie: differenti dalle Talassemie. Una tipica emoglobinopatia che può dare microcitosi è l'Hb E. Queste condizioni sono più gravi.

## Anemie normocitiche

Distinte in Generalmente ed Occasionalmente Normocitiche.

Anemie Occasionalmente Normocitiche

1. Anemia Ipoproliferativa: dovuta a incapacità del midollo, per varie cause, di produrre un numero sufficiente di globuli rossi. Può essere dovuta, nel midollo di un soggetto anziano, al fatto che si sta perdendo la capacità oppure a momentanee infezioni, virosi, soprattutto nei bambini (virus danno una momentanea incapacità di produrre una quantità sufficiente di globuli rossi);
2. Anemie Secondarie a condizioni Maligne: dovute a invasione del midollo da parte di cellule neoplastiche;
3. Anemie Refrattarie con Mielodisplasia: non rispondono a trattamenti che servono a sostenere il midollo;
4. Anemie Emolitiche: la anemia emolitica è in realtà la manifestazione finale di un'incapacità della membrana del globulo rosso di mantenere al proprio interno l'Hb o per un indebolimento della membrana o per agenti esterni al globulo rosso che provocano danni alla membrana o per anomalie metaboliche interne del globulo rosso che provocano la formazione di sostanze che ledono la membrana dall'interno (ad esempio le alterazioni degli enzimi eritrocitari, il caso più tipico può essere il deficit della Glucosio-6-fosfato Deidrogenasi);
5. Emoglobinopatie: alcune possono essere tali da dare anemia con mantenimento del V totale del globulo rosso, queste sono condizioni genetiche;
6. Anemia Post-Emorragica: in un'emorragia la perdita di sangue comporta una diminuzione del V ematico e quindi una diminuzione dell'Hb e questo si traduce in una condizione di anemia;
7. Condizioni Croniche: possono dare origine a un'anemia che può conservare il V di globuli rossi;
8. Sideroblastosi acquisita: per esempio nell'avvelenamento da metalli.

Anemie Occasionalmente Normocitiche:

1. Sideropenia: nella fase precoce non si manifesta con una microcitemia fin dall'inizio, ma lo diventa in una fase successiva.

## Anemie macrocitiche

Anemie Occasionalmente Macrocitiche

1. Dovute a deficit di fattori: Acido Folico, Vitamina B12 sono vitamine che contribuiscono all'espressione dell'Hb in quanto la loro mancanza interferisce con la corretta trascrizione degli acidi nucleici. Il deficit di queste vitamine comporta una ridotta capacità da parte del nucleo di esprimere Hb;
2. Epatopatie: dovute a deficit vari e a un'alterazione metabolica provocata dallo stato di epatopatia, specie se prolungato. Infatti nelle epatopatie viene a mancare la capacità di esterificare il colesterolo e quindi uno quota di colesterolo sempre maggiore tende ad essere sotto forma di colesterolo non esterificato che va ad aderire alle membrane delle cellule -in particolare a quelle degli eritrociti- provocando un ispessimento di membrana;
3. Anemie Emolitiche e Anemia Post-Emorragica: possono essere macrocitiche, nella fase successiva al fatto acuto che ha portato all'emolisi o all'emorragia perché la produzione e l'immissione di molti globuli rossi nel circolo porta alla comparsa di cellule giovani in numero maggiore che sono più grandi rispetto alle cellule più vecchie.

Anemie Occasionalmente Macrocitiche

1. Anemie Ipoproliferative e Anemie Refrattarie.

## Anemia microcitica da deficit di ferro

Il bilancio del Fe è soprattutto basato sull'assorbimento del Fe. Il Fe è un elemento contenuto in quantità molto limitate nell'organismo ed è il più concentrato dei microelementi (tutti gli elementi metallici- rame, manganese, zinco- che sono contenuti in piccole quantità nel nostro organismo ma che svolgono funzioni essenziali). Il Fe è quello tra i microelementi che è contenuto in quantità maggiore nel nostro organismo. La quantità totale di Fe si misura in pochi grammi che però devono essere assolutamente conservati e ne deve essere regolata la quantità di assorbimento perché le perdite del Fe non sono controllabili. L'organismo controlla la quantità di Fe presente grazie al controllo dell'assorbimento.

Le perdite si distinguono in fisiologiche e non fisiologiche. Il sangue mestruale (maggiore rischio per il genere femminile) e la desquamazione epiteliale di cute e mucose (costanti per entrambi i generi; es. desquamazione tratto gastrointestinale, vie biliari, vie urinarie) appartengono al primo gruppo. Al secondo gruppo appartengono le perdite dovute a emorragia. Inoltre durante la gravidanza l'utilizzazione del Fe da parte del feto avviene a spese del Fe materno, quindi è una fase in cui l'apporto di Fe con la dieta deve essere aumentato.

Se in un organismo manca il Fe, il Fe che resta va all'eritropoiesi. Il Fe non viene utilizzato solo per l'eritropoiesi ma anche in altri meccanismi per esempio nella catena respiratoria (citocromi), in alcuni enzimi ossidasici, in alcune strutture cerebrali. Però nel momento in cui il Fe viene a mancare i precursori eritroidi, che sono le cellule che porteranno alla formazione dei globuli rossi, hanno la priorità rispetto agli altri tessuti; probabilmente questo avviene perché la funzione respiratoria è ritenuta più importante per la vitalità dell'organismo.

Nel sovraccarico di Fe l'eritropoiesi procede normalmente, ma l'eccesso di Fe va incontro a meccanismi patologici di deposizione perché il controllo non è fatto sull'escrezione. Questa grande quantità di Fe porta a depositi patologici di Fe che vanno a finire in parenchimi di organi quali fegato, cuore, pancreas e a lungo termine porta a gravi danni, dovuti alla capacità ossidoriduttiva del Fe. Infatti questo è in grado di generare dei radicali che alla lunga portano a problemi nei tessuti in cui si deposita.

Quand'è che si ha un aumento dell'assorbimento del Fe? Il deficit di Fe viene "sentito" da meccanismi interni all'organismo e provoca un aumento, anche di parecchie volte, dell'assorbimento. Inoltre in questo contesto si ha un aumento della velocità dell'eritropoiesi. Ad esempio: in un soggetto con stato emorragico o in un'anemia cronica (talassemia) o in un'anemia cronica dove si abbia uno stato emolitico continuo, in cui c'è una continua eliminazione di globuli rossi che vivono per un periodo limitato dei loro 120 giorni (favismo o deficit di Glucosio-6-Fosfato Deidrogenasi), l'organismo che è sottoposto a un maggior turnover midollare manda un segnale all'intestino per far assorbire più Fe. Questo maggior assorbimento di Fe non è un segnale che ha sempre una finalizzazione, non è sempre positivo per l'organismo. Se serve a causa dell'aumentata eritropoiesi (es. in una situazione genetica, la talassemia) questo signalling va avanti negli anni e porta ad un continuo assorbimento di eccessi di Fe, i quali portano alla deposizione del Fe nei tessuti. Questa è la ragione per cui nelle condizioni ematologiche -ad esempio in talassemie omozigoti- porta a depositi patologici di Fe che poi si traducono in danni per i tessuti. Inoltre lo stimolo eritropoietico ha una potenza maggiore rispetto al deficit tissutale nell'incrementare l'assorbimento di Fe.

## Il ciclo del ferro

Il normale assorbimento del Fe è di 1-2mg al giorno che servono a compensare le perdite giornaliere. Il Fe extracellulare è sempre sotto forma di Fe trivalente e per entrare nella cellula è convertito a Fe bivalente. Il Fe di trasporto non è libero ma è legato alla Transferrina, il Pool Quotidiano di Trasporto per l'eritropoiesi è di circa 24mg die. Per gli altri usi del Fe -enzimi, mioglobina, citocromi- è di circa 5mg die. Il Pool Quotidiano è il rinnovo continuo di Fe che ci deve essere per mantenere funzionali tutte queste varie parti di cui il nostro organismo ha bisogno. La quantità totale di Fe maggiore è nell'Hb, circa 2700 mg. Il Fe necessita inoltre di avere dei depositi per garantire all'organismo quelle fasi in cui non ci siano sufficienti quantità di Fe per garantire queste varie funzioni ed i depositi normalmente sono intorno a 1000 mg, cioè 1 grammo die. Se si somma quindi tutto questo, pochi grammi di Fe sono infine presenti nell'organismo.

Il Fe corporeo è distribuito in vari tessuti -muscolo ad esempio- il Fe totale va da 3 a 5 g di cui la gran parte è nell'Hb.

L'eritropoiesi è normalmente rifornita dal Sistema Reticolo Istocitario per un ciclo; quindi la quantità di Fe che l'eritropoiesi impiega è in genere adeguatamente rifornita dal riciclo dei globuli rossi vecchi. Questi muoiono, il loro Fe viene estratto dal Sistema Reticolo Endoteliale (SRE), presente nella milza e nel fegato eccetera; questo Fe si lega quindi alla Transferrina e viene portato dentro all'eritropoiesi per essere riutilizzato. In condizioni di stabilità dell'eritropoiesi (in un organismo che non ha problemi) è sufficiente questo riciclo; nel momento in cui ci fossero dei problemi si dovrebbe ricorrere ai depositi presenti soprattutto nel fegato. Lo 0,1% del Fe in transito è nella Transferrina, le riserve epatocitarie sono di circa 1 grammo e non ci sono grosse variazioni. Naturalmente in corso di gravidanza, nel deficit di Fe e nel sovraccarico di Fe questa distribuzione si altera.

## Le differenze nel metabolismo del Fe

Il Fe totale corporeo è contenuto in misura differente nel maschio (in media 50 mg/kg) e nella femmina (in media 35mg/kg). Il Fe contenuto nella Transferrina è lo 0,1% e le riserve di Fe vanno da 200 a 400 mg nella femmina e sono 1 g nel maschio.

Abbiamo detto che il bilancio del Fe è basato sul controllo dell'assorbimento e che le perdite non sono controllabili. Queste perdite avvengono in termini di "loss of cells" e in particolare riguardano le cellule intestinali le quali sono preposte ad assorbire il Fe, ma riguardano anche cellule di sfaldamento. Ci sono inoltre delle vie di perdita minore di Fe: il Fe urinario ad esempio (soprattutto tramite cellule), nel sudore (ma questo è variabile e molto basso: 1microgrammo/l). Le perdite totali giornaliere sono nel maschio 1mg di Fe die con un range che va da 0,6 a 1,6mg die, nella femmina alla stessa quantità devono essere sommati da 0,006mg/kg fino a 0,025mg/kg per la media delle perdite mestruali. Nella femmina le perdite sono maggiori e questo spiega perché le riserve siano tendenzialmente più basse. Inoltre si deve sommare la perdita relativa al passaggio del Fe da madre a figlio durante la gravidanza (3,5 volte rispetto a quello che succede nel maschio).

Punti chiave metabolici nella concentrazione del Fe

Cambiamenti nella concentrazione di Hb non sono specifici o non sono sufficientemente sensibili nel determinare il deficit di Fe. Sappiamo che l'eritropoiesi viene automaticamente garantita dai globuli rossi vecchi che si rinnovano, ma nonostante questo una certa perdita di Fe si ha sempre. L'evoluzione dell'abbassamento dell'Hb a seguito di una diminuzione del Fe dell'organismo è lenta: una persona che va in perdita di Fe mostrerà anemia con una latenza che può essere anche di alcuni mesi. Un organismo può avere valori di Fe estremamente bassi prima che si manifesti in modo visibile l'anemia.

Il deficit di Fe prima che compaia l'anemia può compromettere le capacità di tipo neurocognitivo, perché il Fe è anche presente in alcuni enzimi del SNC e può dare delle sensazioni all'individuo che è in deficit di Fe: stanchezza, grande sensazione di astenia.

Le forme di Fe che noi acquisiamo con la dieta includono:

- Ferritina: presente nelle carni animali di cui ci si nutre;
- Eme;
- Fe non Eme.

Lo stato del Fe nelle donne in età riproduttiva è significativamente influenzato dalle perdite di sangue mestruale e possono essere ulteriormente compromesse da altre cause, ad esempio dalle donazioni di sangue. La valutazione di laboratorio dello stato del Fe viene complicata dai cambiamenti fisiologici che si osservano durante la gravidanza.

L'infiammazione cronica che si osserva comunemente nei pazienti ospedalizzati –soprattutto anziani, obesi- può influenzare il sequestro del sangue, che è presente nel corpo ma non è disponibile per l'eritropoiesi, e l'assorbimento di Fe rendendo i biomarcatori dello stato del Fe difficili da interpretare. Si ricordano tra questi ultimi: il Fe, la Transferrina, la Ferritina. Per questo motivo in questi pazienti anziani, obesi o con infiammazione cronica le anomalie dello stato del Fe sono difficili da interpretare.

## Variazioni delle necessità di Fe giornaliere che si osservano in corso di gravidanza

Nella donna in gravidanza le necessità di Fe giornaliere superano ampiamente quelle dell'uomo, si parte da un valore di base di 1mg die fino ad arrivare a un massimo di 6mg die di assorbimento. Quindi è necessario sorvegliare bene il metabolismo del Fe nella femmina rispetto al maschio.

## A fronte di necessità variabili, qual è la quantità di Fe presente nella dieta?

In una dieta media europea il contenuto di Fe è 6mg/1000cal , considerato che normalmente si ingeriscono dalle 1800 alle 2000 calorie die. In caso di giovani le calorie aumentano e negli atleti si può arrivare anche alle 3500cal al giorno. Quindi questi valori (1800-2000cal die) corrispondono a 10-30mg die di Fe che non vengono tutti assorbiti ma quelli assorbiti rappresentano il 5-10% del contenuto. In condizioni di deficit l'assorbimento aumenterà di 3-5 volte grazie all'efficiente sistema di rilevazione della carenza di Fe. L'assorbimento del Fe è massimo nel medio digiuno prossimale e diminuisce in modo progressivo andando verso il digiuno e l'ileo; comunque il Fe può essere assorbito in una certa quota anche nello stomaco. Se un paziente subisce una resezione di un tratto di intestino si verifica un deficit di assorbimento di Fe: sarà quindi necessario somministrare quantità maggiori di Fe o somministrare lo stesso tramite altre vie. Inoltre l'assorbimento del Fe è influenzato dal valore di Ph e dal Potenziale Ossidoriduttivo che si ha nelle zone dove si ha principalmente assorbimento.

I composti che contengono Fe presentano al loro interno enzimi –quali il citocromo C e le catalasi, citocromo A e B, perossidasi- che presentano pochissimo Fe in percentuale ma che sono indispensabili per la funzione cerebrale (vedi sopra).

Il Fe all'assorbimento si presenta principalmente in due forme:

- Fe emico: organicato, derivato da mioglobina, emoglobina ed enzimi emici di chi si nutre di carne animale (anche pesci), di organismi con composizione corporea paragonabile a quella umana. Quando questi alimenti passano nel tubo digerente e arrivano nello stomaco, le proteasi gastriche e l'acidità gastrica liberano l'eme dal resto delle proteine (es. per l'Hb si toglie la globina e resta l'eme). Il vantaggio di questo tipo di alimentazione è che il complesso Fe-eme, che si trasforma perché l'acidità grastrica ossida il Fe e converte l'eme in emina, entra direttamente nell'enterocita. Quest'ultimo entra in gioco nei meccanismi di controllo dell'assorbimento. La percentuale di Fe emico in diete non vegetariane è normalmente il 10-15% in una dieta equilibrata (è una parte minoritaria ma facilmente assorbibile). Questo è dovuto al fatto che l'assorbimento è influenzato dalla composizione della dieta.
- Fe inorganico: presente anche sotto forma di Fe chelato.

La Recommanded Dietary Allowance ci dice che la quantità di Fe necessario per donne non vegetariane in pre-menopausa è di 18mg die, mentre per uomini e donne in post-menopausa è di 8mg die. Questa differenza spiega per esempio perché sia più frequente nelle femmine l'anemia da deficit di Fe: essendo in queste maggiore la necessità nella dieta non è difficile che si abbia un insufficiente apporto di Fe. Nei maschi invece è meno probabile che l'apporto di Fe sia insufficiente.

Per i vegetariani invece questo apporto di Fe deve essere piuttosto alto (14mg die per i maschi, 33mg die per le femmine). Il motivo è che la composizione complessiva delle diete vegetariane influenza l'assorbimento di Fe; il Fe in questione è libero e può subire delle interferenze. In ogni caso non si dovrebbero superare i 45 mg die di Fe per evitare un'eccessiva quantità di quest'ultimo nella dieta che può portare a un eccesso di assorbimento.

## Le sorgenti di Ferro

La sorgente maggiore di Fe emico è il fegato, ad esempio il fegato di bovino ne contiene 7,5mg/100g, mentre la carne in scatola 2,5mg/100g. In generale nelle carni rosse è presente più Fe, nelle carni di pollo ne è presente molto meno, a meno che non si consideri il fegato di pollo. Il pesce –il merluzzo, il salmone- ne ha poco e ne hanno relativamente di più il maiale e il tacchino. Il Fe emico è facilmente assorbibile.

Le sorgenti di Fe inorganico sono i fagioli, dove ce n'è parecchio, gli spinaci, i biscotti ai cereali, il pane integrale, il riso, gli spaghetti.

## L'assorbimento del Fe inorganico

Il Fe si presenta nella dieta come Fe trivalente positivo, ma in genere è legato sotto forma di fitato, di ossalato, di citrato, di lattato, legato a vari tipi di zuccheri, ad aminoacidi. Per l'assorbimento deve essere trasformato in Fe bivalente positivo.

L'assorbimento è influenzato dalla composizione della dieta. Ci sono degli alimenti che aumentano l'assorbimento e altri che lo riducono. Lo favoriscono ascorbati e carni animali perché sono dotati di fattori a basso peso molecolare che veicolano il Fe inorganico, i chetozuccheri (fruttosio), aminoacidi, latte umano. Inibiscono o riducono l'assorbimento le proteine vegetali, il bianco d'uovo il quale ha una proteina che lega il Fe e non lo rende disponibile, il latte vaccino, i pitati ?, alcuni polifenoli contenuti nei legumi e nel vino, i fosfati, le fosfoproteine, la presenza di altri metalli (come gli integratori alimentari, che quindi andrebbero presi a distanza dai pasti).

Le molecole che a livello cellulare sono importanti per l'assorbimento del Fe sono:

- DMT1 (Divalent Metal Trasporter 1): è un trasportatore di mucosa che permette il passaggio del Fe all'interno dell'enterocita;
- Reduttasi: converte il Fe mucosale dalla forma trivalente positiva a quella bivalente positiva;
- Ferroportina: trasportatore basolaterale, è la proteina che serve a trasportare il Fe basolaterale sull'altro lato della cellula intestinale (il lato basale, dove sono presenti vasi sanguigni che raccolgono i prodotti dell'assorbimento); la Ferroportina permette che il Fe bivalente positivo entri in circolo e si leghi alla Transferrina essendo stato previamente trasformato in Fe trivalente positivo ad opera di una Ferrossidasi. La Ferroportina è una proteina che viene regolata da un'altra proteina, l'Epcidina, la quale è l'ormone che il nostro organismo usa come regolatore principale dell'assorbimento del Fe. Questo ormone, prodotto dal fegato, è stato scoperto nel 2000.
- HFE +beta2 miglobulina: modula il rilascio di Fe plasmatico nelle cripte duodenali;
- Recettori per la Transferrina: ci sono due recettori per la transferrina.

## L'importanza dell'ambiente gastrico per l'assorbimento

L'acidità gastrica favorisce l'assorbimento del Fe. I soggetti che abbiano acloridria – per patologie varie- o quelli che siano stati sottoposti a gastrectomia hanno difficoltà nell'assorbimento gastrico

del Fe. Il transito nella mucosa, a concentrazioni elevate di Fe, è passivo; quindi nello stomaco si ha un assorbimento di Fe tanto più elevato quanto più elevato è il Fe nell'alimento ingerito. A basse concentrazioni di Fe invece si ha un meccanismo attivo in 2 step:

1. Uptake da parte della mucosa: avviene tramite un recettore per la Transferrina;
2. Trasferimento del Fe alla lamina propria e poi al plasma.

## La regolazione dell'assorbimento

L'assorbimento è influenzato dalla dieta recente: dopo un bolo consistente le cellule sono refrattarie nei giorni seguenti (il cosiddetto "Regolatore di Dieta"). Se un soggetto sovraccarica la sua dieta di Fe, l'incremento di questo è dapprima notevole ma poi si attenua. L'assorbimento di Fe risente ed è regolato dai depositi di Fe. C'è inoltre un ulteriore segnale che comunica all'intestino quale sia lo stato dell'eritropoiesi, il "Regolatore Intestinale". Tutti questi meccanismi sono sotto il controllo dell'Epcidina. Nonostante questo, è vero che quando l'eritropoiesi è aumentata si ha un conseguente incremento dell'assorbimento di Fe anche se nell'organismo esiste già un sovraccarico di Fe. Quindi il meccanismo dell'eritropoiesi può da solo bypassare tutti i meccanismi di regolazione, ed è troppo correlato alla vitalità dell'organismo stesso per essere ignorato. Questo segnale viene continuamente mantenuto.

L'Epcidina è un piccolo peptide che nasce da un pre-pro-peptide sintetizzato dal fegato -chr, 19, su un particolare gene- il quale nel momento in cui diventa attivo si trasforma in 3 peptidi (uno di 19, uno di 22, uno di 25 aminoacidi). Questo precursore agisce a livello dell'enterocita impedendo che il Fe contenuto all'interno di questa cellula venga passato al circolo legato alla Transferrina e trasportato poi dove deve essere utilizzato. Quindi l'Epcidina quando è presente impedisce che il Fe presente nell'enterocita passi al sangue, agendo sull'Efestina.

L'enterocita ha un proprio ciclo vitale che va dalla cripta al villo. Nell'intestino da un punto di vista microscopico vi sono tanti enterociti che sono disposti in sequenza a formare una mucosa; l'assorbimento è massimo in corrispondenza della cripta. Man mano che le nuove cellule si formano scorrono, arrivano nella cripta fino ad arrivare al villo, dove gli enterociti vengono persi in quanto cellule vecchie. Se la cellula intestinale non riceve alcun segnale, il Fe in essa contenuto viene scaricato (prima di morire) al villo, dove ci sono i vasi. Se riceve invece il segnale dall'Epcidina la cellula non rilascia il Fe al livello del villo e viene persa e sostituita da altri enterociti più giovani. Il Fe perso giornalmente è proprio quello presente in queste cellule e serve a mantenere l'equilibrio con il Fe assorbito. La regolazione del Fe fa in modo che giornalmente una riserva di Fe (1-2mg) sia presente nelle cellule intestinali, in condizioni normali questo Fe non viene utilizzato e viene perso, mentre in condizioni di carenza marziale si ricorre a queste riserve intestinali. Si mantiene quindi un equilibrio tra le esigenze dell'organismo e le perdite di Fe durante il giorno. Nel momento in cui ci fosse una grande necessità di Fe da parte dell'organismo il meccanismo dell'Epcidina non funziona: questa non viene sintetizzata dal fegato e il Fe può essere trasportato in circolo. L'Epcidina funziona proprio come meccanismo di blocco, quanto più ne è presente tanto più blocca l'assorbimento del Fe, tanto più è assente tanto maggiore sarà la quantità di Fe assorbita. C'è un limite nell'assorbimento di Fe che dipende dalle condizioni della dieta, dallo stato del tubo gastro-intestinale (in caso di patologia infiammatoria in questa zona verrà assorbito meno Fe), dalle esigenze dell'organismo in quel momento (in gravidanza si consiglia alle donne di prendere del Fe supplementare per compensare le perdite eccessive).

*Saltata frase perché incomprensibile*

L’Epcidina blocca anche il Fe contenuto nei macrofagi, che sono i responsabili della cattura dei globuli rossi invecchiati e del riciclo del Fe. Se esiste un eccesso di Fe, l’Epcidina provoca un blocco anche di questo riciclo e fa mantenere il Fe all’interno del Sistema Reticolo Istocitario. Invece quando la sideremia diminuisce troppo l’espressione di Epcidina è ridotta per favorire l’assorbimento del Fe. L’Epcidina agisce quindi su due punti. Questa è prodotta dal fegato, agisce sulle cellule intestinali e sulla pro??? Gli enterociti assorbono Fe ed eme dalla dieta e i macrofagi dagli enterociti senescenti o da altre vie. Entrambe le cellule rilasciano il Fe nel plasma, il quale è poi incorporato nell’Apotransferrina dopo oscillazione a Fe bivalente positivo via Efestina. Gli epatociti producono Epcidina in risposta ad alte concentrazioni di Fe o infiammazione e ciò inibisce l’afflusso di Fe via Ferroportina e promuove la sua ritenzione negli enterociti e nei macrofagi.

Quando un organismo ha un deficit di emoglobina conseguente a deficit di Fe, uno dei primi segnali che vengono dati dall’organismo proviene dal rene. Qui entrano in campo le Hif (proteine continuamente sintetizzate dal nostro organismo che servono a segnalare lo stato di ossigenazione dei tessuti: Hif1α, Hif 1β). L’Hif agisce su quella parte del rene, la porzione iuxtaglomerulare, che produce l’EPO (eritropoietina). Questa arriva al midollo osseo e induce un segnale che stimola l’eritropoiesi e in contemporanea stimola anche il meccanismo di assorbimento del Fe, infatti non può avvenire eritropoiesi senza Fe. Quindi ecco perché l’espressione di Epcidina viene bloccata quando c’è bisogno di avere maggior assorbimento di Fe.

Il punto critico di ossigenazione dell’organismo è il sangue: quanto più sangue si ha tanto più ossigeno è presente nei tessuti, tanto più rendo da un punto di vista muscolare. Per esempio quegli atleti che si iniettano EPO –parliamo di quelli che fanno sport aereobici- possono rendere di più perché fanno più massa sanguigna e riescono a trasportare più ossigeno. Questo meccanismo alla lunga però induce un sovraccarico di Fe e inoltre la formazione di anticorpi (ab) anti EPO che possono portare a perdita della funzione EPO (Anemia Aplastica) in questi soggetti.

## Il trasporto del Ferro

La Transferrina è una proteina, presente nel sangue e misurabile in laboratorio, che è in grado di trasportare fino a due atomi di Fe. Il Fe libero potrebbe non circolare per tre motivi: perché non è solubile, perché tenderebbe immediatamente a depositarsi nei tessuti e inoltre tenderebbe a generare radicali liberi. L’organismo ha escogitato un sistema per cui il Fe si lega a una proteina e diventa quindi solubile, la sua reattività è attenuata ed è in grado di essere rilasciato alle cellule. La Transferrina si lega sempre a un recettore per la Transferrina che è presente principalmente nelle cellule implicate nel metabolismo dell’eme e a quelle eritropoietiche. In circolo vi sono quattro forme di Transferrina:

- Apotransferrina: proteina senza Fe che costituisce la maggioranza della Transferrina;
- Transferrina Monoferrica che lega un unico atomo di Fe al C-terminale;
- Transferrina Monoferrica che lega un unico atomo di Fe al N-terminale;
- Olotransferrina che lega due atomi di Fe ed è per questo completamente saturata.

Nel nostro organismo la Transferrina è saturata per circa 2/3.

L’Olotransferrina legata ai due atomi di Fe viene riconosciuta attraverso un recettore che è posto in un rientro della cellula, che può essere epatica o eritropoietica. In questo pozzetto e sulla sua membrana c’è un trasportatore di metallo divalente. Nel momento in cui al recettore si lega la Transferrina, il pozzetto si chiude e va a formare un endosoma il quale al suo interno tramite una pompa protonica accumula ioni idrogeno e aumenta in questo modo l’acidificazione. Questo facilita il rilascio del Fe dalla Transferrina. Questo può essere rilasciato all’interno della cellula stessa se è

questa è di deposito (es. fegato): il Fe attraverso un trasportatore per metalli divalenti diventa Fe divalente positivo, viene incorporato nella Ferritina e poi può addirittura trasformarsi in Emosiderina. La Ferritina è la proteina di deposito del Fe, contiene da centinaia a migliaia di atomi di Fe all'interno, mentre l'Emosiderina ne contiene ancora di più. La Ferritina è in equilibrio di azione di massa con Ferritina esterna alle cellule e può essere misurata nel sangue (quella piccolissima quantità presente nelle cellule) e dare una misura stimata del deposito di Fe. Per esempio 1 microgrammo di Ferritina circolante corrisponde a circa 8 mg nei depositi; quindi posso stimare grosso modo quanti depositi di Fe ci sono misurando la Ferritina.

Un altro destino del Fe all'interno della cellula muscolare è quello di essere posto nella catena respiratoria del mitocondrio oppure inserito nell'eritropoiesi eccetera.

Cosa succede alla molecola di Transferrina? Questa viene riportata fuori e rilasciata. C'è dunque un utilizzo al risparmio da parte dell'organismo per tutto quello che concerne il metabolismo del Fe. Una particolarità è che una frazione del Fe intracellulare resta a costituire il cosiddetto Pool del Ferro Labile. Questo è un meccanismo che serve a segnalare ai geni, che sono correlati all'espressione delle molecole che hanno importanza nel metabolismo del Fe, qual è la concentrazione del Fe. Se quest'ultima è eccessiva si fa in modo che il Fe venga portato ai depositi oppure venga reso non disponibile; se invece la concentrazione è bassa si sfrutta questo segnale per dire al gene di esprimere -ad esempio- le proteine che servono per l'eritropoiesi. Sono meccanismi di regolazione e controregolazione della segnalazione molto interessanti.

*L'ultima frase fa interamente riferimento all'immagine*

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 14/3/2013 (1)

---

# Medicina di laboratorio 14/03/2013

Professore: Gian Cesare Guidi

Sbobinatore: Martino Gerosa

Revisore: Anna Morandini

<u>METABOLISMO DEL FERRO</u>

*Epcidina*

Continuiamo a parlare di **Epcidina**, ormone di natura proteica, che regola l'omeostasi del  Ferro. Il suo meccanismo d'azione è basato sull'inibizione dell'assorbimento del ferro, cioè **più epcidina** viene prodotta **meno ferro** viene assorbito e viceversa. Di conseguenza regola quella parte critica del metabolismo del ferro che è l'assorbimento, visto che il nostro organismo non controlla eventuali perdite. La sua azione si esplica a livello degli enterociti, inibendo il trasporto trans-epiteliale del ferro mediato dal trasportatore Ferroportina, meccanismo presente nella maggior parte di queste cellule. È anche in grado di agire sul sistema reticolo endoteliale e quindi di inibire la fuoriuscita di ferro dai macrofagi per andare nell'emopoiesi, coniugato nel plasma alla **transferrina**.

L'epcidina si comporta inoltre come una proteina della fase acuta. L'espressione delle proteine di fase acuta è stimolata da meccanismi infiammatori che determinano l'aumento della loro concentrazione nel sangue. Negli stadi infiammatori si osserva aumento nel sangue di tutta una serie di proteine, come la proteina C reattiva o il fibrinogeno, che hanno in qualche modo una funzione di protezione sul nostro organismo contro le invasioni di batteri o altri microorganismi.

Quello dell'epcidina è un meccanismo evolutivo che non si osserva solo nell'uomo ma anche in altri animali: impedisce che eventuali microorganismi invasori possano utilizzare il ferro dell'organismo, riducendo o addirittura azzerando il meccanismo di trasporto del ferro. Molti di essi lo usano per inserirlo nei loro sistemi di patogenicità (o virulenza) che consentirebbero di agire in modo molto attivo, provocando patologie. Evidentemente, rendere indisponibile il ferro, aveva una sua funzione importante in epoca pre-antibiotica, ora viene in aiuto anche la farmacologia.

L'epicidina possiede una discreta attività antifungina, poco o nulla antibatterica, quindi il meccanismo è rivolto più contro i miceti che contro i batteri come organismi invasori. Da tenere a mente che le micosi sono soprattutto frequenti negli individui immunodepressi.

La codifica dell'Epcidina è deputata al gene HAMP sul cromosoma 19, espressa come pre-propeptide, il quale subisce modificazioni post-traduzionali venendo convertito in peptidi attivi di 20, 22 e 25 amminoacidi. Si tratta di una piccolissima molecola paragonata ad altre proteine che circolano nel nostro sangue, compresa l'albumina.

Le mutazioni del gene HAMP causano emocromatosi tipo 2B. Queste mutazioni impediscono una corretta espressione del gene che determina una non-regolazione dell'assorbimento del ferro. A questo è associato un meccanismo più complesso, infatti, per la maggior parte, le emocromatosi giovanili sono dovute a mutazioni della proteina *Emogiuvelina*, un regolatore della produzione di epcidina (nel nostro organismo non sempre le molecole effettrici agiscono "indisturbate", ma c'è tutta una serie di meccanismi di regolazione e controregolazione che servono a far si che le azioni di singole proteine non siano mai lasciate libere di agire senza possibilità di controllarle).

L'Epcidina, dato il suo basso peso molecolare viene escreta con le urine e può essere di conseguenza misurata. I metodi d'elezione per determinarne la concentrazione si basano sulla spettrometria di massa, in quanto le sue ridotte dimensioni rendono poco attendibili i risultati di metodi immunometrici come ELISA, per quanto esistenti. Gli spettrometri consentono di misurare una molecola tramite la frammentazione e l'identificazione del peso molecolare delle sue singole componenti.

*Regolazione del Ferro intracellulare [slide 30]*

Le cellule sono in grado di controllare l'espressione delle proteine collegate alla conservazione del ferro, deputate a metterlo in un deposito temporaneo che consenta di utilizzarlo secondo necessità (come gli epatociti che accumulano ferritina), o al suo trasporto.

L'espressione dei sistemi di cattura del ferro circolante (up-take) saranno soprattutto basati sulla regolazione delle due proteine principali connesse alla captazione di Fe da parte delle cellule, cioè la **transferrina** circolante ed il **recettore per la transferrina.**

Nel **<u>defict di Ferro</u>** l'espressione di queste due proteine sarà aumentata perché l'organismo cerca di aumentare tutta la componente proteica che serve per captare la massima quantità possibile di ferro. L'espressione di epcidina verrà repressa e tutto il Fe che entra dell'enterocita e passa in circolo dovrà essere catturato da parte delle cellule che sentono questo deficit di Ferro, aumentando i recettori alla superficie della cellula e quella proteina che ha un'elavatissima affinità per il Ferro che è la transferrina.

In caso di **<u>eccesso di Ferro</u>** le cellule, che al loro interno sentono questo eccesso in quanto sono presenti dei meccanismi di segnalazione, reprimono l'espressione dei geni di transferrina e recettore della transferrina.

Sono presenti inoltre le proteine deposito, ovvero la **ferritina**. Nel sovraccarico di Fe, ci sarà necessità di una sovra-regolazione del gene della Ferritina per immagazzinare il Ferro in eccesso, nel deficit avverrà il contrario (diminuzione della sua espressione).

*IRP [slide 32]*

Nelle cellule sono presenti due proteine citoplasmatiche, IRP 1 e 2 (Iron Regulatory Protein), sensibili alla concentrazione di Ferro (bivalente all'interno della cellula, ferro ferroso) nel pool labile intracellulare (LIP).

Una quota di Ferro è libero nel citoplasma, in equilibrio con il LIP, e funge da sensore per segnalare alla cellula qual è il bilancio di tale ione al suo interno. Se questo è basso si attueranno quei meccanismi di regolazione genica che prevedono l'espressione delle due proteine menzionate precedentemente (transferrina e recettore della trasferrina) e viceversa se lo stato di Fe è elevato; inversamente è regolata l'espressione della ferritina.

La regolazione di questi geni avviene post-trascrizionalmente, in quanto sul loro mRNA è presente una sequenza IREs (iron Responsive Elements) che viene legata specificamente dalle proteine IRP ferro-regolatrici.

IREs è costituita da un dominio ad ansa di 28 nucleotidi. Inoltre, le proteine IRP presentano diversa distribuzione nei vari tessuti:

- IRP 1 è localizzata prevalentemente in quei tessuti deputati al deposito di Ferro (Fegato, Milza);

- IRP 2 presente nelle cellule di quei tessuti in cui il Ferro viene abbondantemente utilizzato (Muscoli scheletrico e cardiaco).

Da tener presente che nella maggior parte dei tessuti sono presenti entrambe le forme.

*IREs [slide 34]*

Nell’immagine sono rappresentati gli Iron Responsive Elements, IRE, quelle parti del mRNA che legano le IRP. Nello specifico sono descritti quelli del recettore per la transferrina, per la ferritina e per l’ALA-sintasi (gene importante per l’eritropoiesi, in quanto implicato nel metabolismo delle porfirine, anelli non proteici al centro dei quali è legato il Ferro).

A bassa concentrazione di Fe intracellulare la traslazione dell’mRNA della ferritina è bloccata dal legame di IRP su IRE, quella per Tfr, DCT1 e FEP è favorita dal binging di IRP ad alta affinità.

Nell’immagine seguente sono rappresentate le forcine risultanti dall’assemblaggio di IRP su IREs che danno il segnale al complesso traslazionale di sintetizzare o meno la proteina codificata da quel mRNA *(libero riassunto, in quanto il discorso era particolarmente confuso, NdR).*

*RECETTORE della TRANSFERRINA [slide 42]*

È una proteina presente sulla membrana delle cellule, in particolare di quelle eritropoietiche. La sua funzione è captare il ferro circolante legato alla transferrina. L’esterno della cellula vede lo sporgere di questa parte (*la parte che lega la transferrina NdR)* della molecola del recettore, che poi trapassa l’intera membrana cellulare ed arriva a sporgere nel citoplasma. Il recettore per la transferrina è la sola via fisiologica di ingresso di Ferro nella cellula; tutte le cellule che ne hanno bisogno presentano questi recettori (praticamente tutte, in quanto tutte hanno i mitocondri. I globuli rossi nonostante privi di organuli hanno comunque necessità di internalizzare Fe. Nei due casi cambia solo la quantità di Fe di cui la cellula ha bisogno).

I TFr possono essere presenti in misura maggiore o minore sulla superficie perché vengono espressi in funzione dell’esigenza: se la cellula ha poca esigenza di Fe ce ne saranno pochi, ma se in un momento particolare ha bisogno di più ferro ne posizionerà di più.

In generale il numero delle molecole di recettore per la transferrina è più alto nelle cellule del midollo osseo, della placenta e del fegato, che sono sistemi cellulari in cui c’è una maggior necessità di Fe.

Quando la funzione del recettore non è più richiesta, la cellula ne rilascia la porzione extracellulare in forma monomerica solubile che circola nel sangue complessata alla Transferrina, per la quale mantiene l’affinità.

Le cellule maggiormente interessate da questo processo sono le cellule eritropoietiche, eritroblasti e reticolociti, che hanno ancora recettore per la transferrina.

I livelli di questo recettore solubile sono determinati dall’attività eritropoietica midollare che può causare variazioni da -8 volte a +20 volte rispetto ai valori normali e quindi la sua misura è ritenuta utile per valutare l’attività eritropoietica: se è basso vuol dire che l’eritropoiesi è rallentata, se è elevato c’è una forte attività eritropoietica. Per misurare questo valore sono state sviluppate metodiche di laboratorio basate su principi di immunometria (non è un test di primo livello per la valutazione dello stato di ferro, come lo è invece la ferritina).

La **ferritina** è deputata a mettere in deposito il Ferro**,** una molecola complessa a forma di guscio, al cui interno sono raccolti centinaia e addirittura migliaia di atomi di Ferro. Questa forma di

conservazione si rende necessaria per escludere gli ioni dal contatto con le molecole di acqua, in quanto la reattività del Ferro può comportare la formazione di radicali liberi dannosi per la cellula. La formazione di ROS, danno ai parenchimi e conseguente fibrosi, è ciò che si verifica in quei soggetti che presentano accumuli di Ferro.

La molecola di ferritina è composta da una serie di catene di due tipi: catene H e catene L. Queste si combinano in maniera e misura differente:

- prevalenza di catene L (da Liver = Fegato) in quei tessuti ove prevale la funzione di deposito del ferro;

- prevalenza di catene H (Heart = Cuore) nei altri tessuti, ove la Ferritina può svolgere un ruolo protettivo da eccessivi accumuli di Ferro.

Le molecole di Ferritina mantenute per lunghi periodi all'interno di un organo, tendono a trasformarsi in una forma "denaturata" della molecola, chiamata **Emosiderina.** All'interno di questa sono accolte migliaia di molecole di Fe. Se il loro numero aumenta eccessivamente può diventare un segnale di alterata eritropoiesi: aumenti di emosiderina si registrano appunto nelle emosiderosi.

[*mostra una slide contenente una tabella in cui sono riportati vari parametri]*

In questa tabella sono riportati dei valori attraverso i quali si può monitorare una progressione verso un deficit di Ferro. In un soggetto normale si può stabilire quali siano i valori idonei per un congruo contenuto di Ferro, che è stabilito ad un punteggio di 2,3. Questo scende ad 1 nelle prime fasi di un bilancio negativo del Fe (assorbimento non sufficiente a compensare le perdite). Nel momento in cui a questo scarso assorbimento si sommi una deplezione delle riserve di Fe si passa ad un valore fra 0 e 1 e qualora si abbia un'eritropoiesi in presenza di defict di ferro, il valore di Fe presente all'interno del midollo è pari a zero e rimane tale nell'anemia da deficit di ferro.

In questa progressione non tutti i valori diminuiscono ugualmente: ad esempio, il numero di eritrociti prodotti mantiene un valore di normalità fino a quando si instaura eritropoiesi in presenza di deficit di ferro. Questo ci suggerisce che il meccanismo di riciclo di ferro ha un'elevata efficienza e consente di mantenere funzionante l'eritropoiesi a lungo anche quando ci sono segni leggeri o già piuttosto consistenti di mancanza di Fe nell'organismo. Il numero di eritrociti e dell'emoglobina (*in questa tabella per Hb sono segnati 2 valori, cioè minimo e massimo per maschio e femmina)* si mantengono in un range accettabile fino ad una fase avanzata di deficit di ferro. Di conseguenza il nostro organismo non mostra i segni di tale deficit, dal punto di vista dell'eritropoiesi, finchè non si instaura un deficit conclamato, in cui le riserve sono esaurite.

Un segno precoce (*del deficit di Ferro NdR*) è quello della presenza di protoporfirina eritrocitaria. Un altro segno ancor più precoce è quello della misura del Ferro plasmatico (in microgrammi/decilitro): il fatto che abbia dei valori ancora accettabili anche in uno stadio un po' più avanzato è dovuto alla mobilitazione delle riserve, ma non appena finiscono anche queste non c'è più nulla da mobilizzare e comincia a evidenziarsi la sua carenza.

(*Registrazione disturbata, sembra che dica "I tipici", nel senso dei parametri tipici NdR)* La Transferrina tende ad aumentare perché nel momento in cui l'organismo sente il deficit di Ferro comincia ad aumentare l'espressione delle proteine legate al suo trasporto (qui "transferrina" è misurata come capacità di trasportare il Ferro).

Il segnale più forte è quello legato alla **ferritina**, cioè dei depositi. La ferritina circolante è in equilibrio di azione di massa con la ferritina dei depositi; purtroppo non è una regola fissa perché anche la ferritina risente della fase acuta.

In un soggetto in fase acuta o affetto da malattie croniche in cui ci sia una componente infiammatoria costante, la ferritina aumenta e di conseguenza non può sempre essere un parametro attendibile.

In tutti gli altri casi, tale parametro può indicare precocemente un deficit nelle fasi primarie.

Il recettore solubile per la transferrina si comporta allo stesso modo della transferrina: normale nelle situazioni in assenza di deficit, tenderà a salire in relazione all'aumento del deficit, questo perché la cellula tende ad captare il più possibile il ferro circostante.

La percentuale di saturazione della transferrina con il ferro ha due siti di legame: olo-T o mono-transferrina saturate.

Complessivamente circa un terzo della transferrina è satura di ferro, tale valore sarà direttamente proporzionale al diminuire del ferro. Ma anche questo segnale compare solo dopo che l'eritropoiesi è già alterata.

Il **segnale migliore è quello fornito dalla ferritina**, con le cautele per la presenza di una fase infiammatoria (anche la transferrina risente della fase infiammatoria, ma in senso opposto alla Transferrina, tende infatti a diminuire). Risulta essere più attendibile se combinato con i dati della Transferrina e del Fe.

*Valutazione delle riserve nel deficit di Fe*

La misura della quantità di ferritina si ricava con un test eseguito sul siero tramite metodi immunometrici, comunemente impiegati in laboratorio. Si può così stimare i valori dei depositi di ferro, perché in un soggetto (che non mostri uno stato infiammatorio) 1 mg/l  ferritina corrisponde a circa 8-10 mg di Ferro in deposito (1 gr di deposito totale nel maschio, 0,4-0,8 nella femmina). Va tenuto presente che infiammazioni ed epatopatie aumentano i livelli di ferritina, senza rapporto con i depositi.

*Diagnosi dei Deficit di Fe*

Il rapporto tra Recettore solubile della trasferrina (sTFr) e la Ferritina, è una modalità con cui si può valutare la prevalenza su larga scala, a livello di popolazione, dei deficit di ferro. Ci sono popolazioni in cui c'è un ridotto apporto alimentare di ferro, in quanto, gli alimenti che lo contengono non sono disponibili in misura adeguata. È stato proposto questo metodo, con valore soprattutto epidemiologico, per valutare la presenza o l'assenza di Ferro nella dieta e la risposta alla terapia. Non è un metodo molto usato, è presente quasi esclusivamente in letteratura.

Un altro metodo, che è ritenuto il Gold Standard (standard di riferimento diagnostico) per valutare le riserve di ferro è la quantificazione del ferro midollare con il metodo di Perls (mette in risalto la presenza di cellule con granuli di ferro). Ma non è sempre praticabile, in quanto implica un puntato sternale, che è una metodica invasiva (meglio avvalersi dei dati forniti dalla misurazione della ferritina).

*Eritropoiesi nel deficit di ferro*

Se si vuole andare ad indagare le conseguenze di un deficit di Ferro e voglio proprio osservare al microscopio per vedere cosa osservo, gli eritrociti in presenza di un deficit di Ferro si presentano piccoli, ipocromici, con alterazioni di forma quindi anisocitosi e poichilocitosi con ipocromatosi e microcitosi. Per esperti la semplice osservazione al microscopio può essere esaustiva, ma prevede la preparazione di un vetrino, la colorazione, eccetera. Esistono però adesso con gli strumenti ematologici automatizzati e con le modalità di analisi chimico-cliniche, altri metodi di valutare l'andamento dell'eritropoiesi nel deficit di ferro, per esempio la misura del MCV (volume medio delle cellule) e dell'RDW (esprime la dispersione dei volumi degli eritrociti); un segno precoce è di valutare la concentrazione di Hb raggiunta dai reticolociti, che sono in grado di sintetizzarla, ma un reticolocita in presenza di deficit di Ferro sintetizza meno Hb rispetto al normale. Ma poiché il reticolocita permane in questa condizione solo per qualche giorno (poi matura ad eritrocita) se si valuta quanta Hb ha espresso quel reticolocita, possiamo dire già in questa fase se c'è un'anemia o no (segno precoce, valutazione in presenza di eritropoiesi che non è ancora influenzata dal deficit di ferro).

Esistono degli altri test che consentono di valutare l'eritropoiesi in presenza di deficit di Ferro, ad esempio la ZnPP, cioè la zinco protoporfirina. Questa è una protoporfirina, un "eme" in cui al posto del Ferro c'è lo Zinco; in piccole quantità se manca il ferro, lo zinco circolante nel nostro sangue lo può sostituire, in quanto è un elemento che ha molte similitudini col ferro e compare sotto forma di zinco protoporfirina. Quindi quanta più ZnPP è presente tanto più c'è deficit di ferro. Però esistono problemi di specificità, poiché altre cause possono condurre ad un aumento della ZnPP (piombo ad esempio, ma anche altre cause).

*(il professore cita le cause fisiologiche del deficit di ferro, come gravidanza, deficit dell'alimentazione, crescita accellerata, ma le sorvola poichè già discusse nella lezione precedente NdR)*

*Cause patologiche del deficit di ferro*

Sono dovute a perdite di sangue soprattutto dall'apparato digerente (ulcere, tumori, celiachia), cause di deficit di Ferro di cui non ci si accorge subito, perché avvengono per perdita di sangue molto lenta, che però portano ad una incapacità di parti dell'organismo di assorbire completamente una parte del Ferro per quanto piccola. È sufficiente un lieve sbilancio (anche mezzo mg al giorno) per provocare nel lungo periodo un deficit.

La diagnosi di laboratorio è basata sulla ricerca di sangue occulto nelle feci, valutando vari tipi di anticorpi che possono giustificare per esempio la celiachia; inoltre si possono valutare altri parametri come la gastrina, anticorpi anti-cellule parietali, ecc.

La presenza di infezione da parte di *Helicobacter Pylori*, batterio acidofilo che colonizza lo stomaco determinando emorragie continue e diffuse, può essere valutata dall'ureasi breath test. Questo test si basa sulla capacità del microorganismo di metabolizzare composti di Carbonio. Si somministrano alimenti contenenti l'isotopo 13 del carbonio che può poi essere facilmente misurato nell'aria espirata dopo che è stato degradato dall'ureasi batterica prodotta dall'*H.Pylori*.

## EMOGLOBINA

Molecola deputata al trasporto dell'$O_2$. Consegna l' $O_2$ alle cellule in modo che rifornisca il loro sistema mitocondriale, il quale deve mantenere una pressione parziale costante del gas, seppur bassa. Questo rifornimento è necessario per garantire un'adeguata produzione di energia. La produzione di energia avviene tramite il sistema basato sui citocromi (*ndr catena respiratoria),* l'ossigeno serve a far funzionare questo ciclo, che è molto efficiente nel produrre ATP rispetto al ciclo non basato sull'ossigeno (*ndr glicolisi).* La nostra vita dipende dalla combustione lenta del glucosio, in presenza di $O_2$.

La funzione di trasporto dei gas attraverso il sangue rappresenta un punto critico per il nostro organismo, in quanto l' $O_2$ diffonde molto lentamente in un liquido come l'acqua e viene trasportato con esso in quantità limitata.

L'emoglobina (Hb) ha la funzione di aumentare la capacità di trasporto di ossigeno del mezzo liquido. Più Hb è presente nella circolazione più l'organismo è in grado di trasportare ossigeno migliorando di conseguenza la resa energetica cellulare.

Oltre all'$O_2$ trasporta, in misura minore, l'anidride carbonica, che però viene veicolata meglio dall'anidrasi carbonica e dalla banda 3 (funziona da scambiatore anionico) che sono pure presenti nel globulo rosso. Quindi l'emoglobina può trasportare l'ossigeno (*anidride carbonica è 1) meno affine all'emoglobina e 2) possiede altri sistemi di trasporto NdR)* anche se esiste la carbamino-emoglobina, cioè quella parte di Hb che ha una sua regione contenente anidride carbonica.

La molecola dell'emoglobina è formata da 4 globine, ciascuna con un proprio eme legato ad un atomo di Ferro. La sua struttura è tale per cui consente il passaggio dell'ossigeno, ma all'interno è idrofobica per isolare lo ione bivalente che contiene, che è estremamente reattivo (più reattivo del trivalente). Delle 4 globine costituenti, due sono di tipo alfa e due di tipo beta (Hb A, 97%, ma esistono anche un'Hb A2, 2%, ed un'Hb F, 1%, fisiologiche).

*Meccanismo di trasporto dei gas*

Quando il globulo rosso arriva alla periferia si trova in un ambiente ricco in $CO_2$ che, essendo diffusibile, diffonde anche all'interno dell'eritrocita. Dopo la sua entrata nella cellula, tende ad idratarsi ad acido carbonico per mezzo di un processo catalizzato dall'Anidrasi Carbonica.

L'acido carbonico in realtà non esiste come tale perché si dissocia immediatamente in ione bicarbonato con aumento della concentrazione di protoni. La diminuzione del pH conseguente ha una sua funzione in quanto provoca il rilascio di ossigeno da parte dell'Hb con formazione dell'Hb deossigenata.

È necessario mantenere un equilibrio anionico all'interno del globulo rosso, affinchè il $HCO_3$ (bicarbonato) appena formato non tenda ad uscire, ritornando nel plasma. Per far ciò uno ione $Cl^-$ viene convogliato all'interno del globulo rosso.

Per quanto detto a seguito del rilascio di ossigeno aumenta la concentrazione di cloro nell'eritrocita. Questo meccanismo è critico nel mantenimento dell'equilibrio acido-base del nostro organismo, che si mantiene ad un pH costante di 7,40 con oscillazioni molto piccole (range tra 7,38 e 7,42).

L'efficienza del trasporto di ossigeno da parte dell'emoglobina è di 20 ml di ossigeno in 100 ml di sangue con ematocrito del 45% (con meno della metà del volume di globuli rossi), rispetto a 0,5 ml di ossigeno che sono invece trasportati dal plasma.

Ogni globulo rosso vive in media 120 giorni e compie in questo periodo una distanza di circa 300 km, passando 500.000 volte per il cuore e 10.000 volte attraverso la milza. Quest'ultimo è un passaggio critico perché la cellula si trova ad affrontare un ambiente estremamente ostile, con bassa concentrazione di glucosio e bassa pressione di ossigeno.

Queste condizioni costituiscono un "test da stress", mettendo in evidenza quegli eritrociti invecchiati che devono essere eliminati.

L'Hb rilascia ossigeno secondo una curva sigmoide, non linearmente. Questo tipo di curva è possibile perché la molecola dell'Hb presenta caratteristiche allosteriche: l'associazione di ossigeno ad una delle 4 globine costituenti viene favorita dalla presenza di molecole di ossigeno precedente legate ad un'altra subunità della stessa Hb.

Quanto più i 4 monomeri si saturano di ossigeno tanto più è favorita l'ossigenazione.

Il legame tra Hb e ossigeno è condizionato anche dalle caratteristiche dell'ambiente. Nel polmone vi è un'elevata concentrazione di ossigeno e pH più basico, mentre in periferia l'ambiente presenta maggior concentrazione di protoni, dovuta al rilascio di $CO_2$ e di altri tipi di acido da parte dei tessuti (es. Acido Lattico).

*Effetto bohr*

La differenza fra pH nei due distretti favorisce, a livello periferico, il rilascio di ossigeno da parte dell'Hb. Questo meccanismo è noto come **effetto Bohr:** variazioni della $pCO_2$ ,e in generale della componente acida, determinano uno shift a destra della curva di dissociazione dell'Emoglobina (*grafici sulle slide)*.

Elevata $pCO_2$ provoca diminuzione di affinità per l'ossigeno. Il meccanismo consiste nel rilascio di $CO_2$ da parte dei tessuti, che entra nei globuli rossi ed è convertita in bicarbonato e $H^+$. l'$H^+$ provoca un'inibizione dell'attività e quindi un rilascio di ossigeno maggiore e in misura minore di un legame di $CO_2$ al terminale aminico delle catene alfa e beta globiniche (effetto minore).

*[mostra un grafico sull'effetto Bohr Ndr]*

L'effetto Bohr viene misurato tramite questa curva di dissociazione doppio logaritmica, log della P50 (pressione dell'ossigeno alla semi-saturazione dell'Hb, che normalmente, per l'Hb a, è intorno ai 27,5 mmHg) in funzione del pH.

Il valore normalmente assunto dalla P50 è molto basso, ciò comporta che il sangue venoso alla periferia del nostro organismo presenta comunque una Hb saturata al 50%. Questa riserva non viene utilizzata perché è posta sulla parte di massima pendenza della curva di dissociazione (quindi provoca dei meccanismi rapidissimi di desaturazione che possono avere conseguenze irreparabili per il nostro organismo).

L'effetto bohr può essere facilmente misurato tramite la funzione esistente fra pH e legame di ossigeno, corrisponde al valore di minimo snodo della curva che rappresenta le variazioni di P50 in funzione del pH (in questo caso non è la curva di dissociazione). Legandosi ai protoni l'Hb agisce

come tampone e mantiene il pH vicino alla neutralità. Gli $H^+$ si legano a specifici siti della molecola e ne stabilizzano i legami. Il meccanismo è di tipo "conformazionale", che va ad agire sulla forma della molecola. Nei tessuti ove l'attività metabolica è alta, la produzione di $CO_2$ porta alla diminuzione del pH, abbassando l'affinità dell'Hb per l'ossigeno e favorendone il rilascio, meccanismo molto efficiente quando si tratti di liberare ossigeno e avviene in condizione di acidosi.

A livello polmonare dove la quantità di ossigeno non è critica, questo meccanismo non ha molta importanza. Il rilascio di $CO_2$ nei polmoni porta ad un aumento di pH e quindi si verifica il meccanismo opposto: la molecola di Emoglobina assume una conformazione che favorisce il legame con $O_2$.

*2,3 - DIFOSFOGLICERATO*

Prodotto collaterale della via glicolitica, presente all'interno del globulo rosso. Ha una concentrazione che normalmente è di 4,5 mmol/l, corrispondente a quella dell'emoglobina considerata in monomeri. Ogni mole di globina vede come corrispettivo una mmole di 2,3-DPG. La funzione di questa molecola è diminuire l'affinità per l'ossigeno, quindi sovrapponibile a quella svolta dall'effetto Bohr.

Questo meccanismo si instaura quando la pressione parziale di ossigeno diminuisce ad altitudini superiori ai 1500m.

Esempio: escursione in montagna sopra i 1500. La prima sera si avrà un forte mal di testa, perché l'ossigenazione è scarsa. Dopo un certo tempo, i meccanismi di segnalazione, che sono basati su dei sensori dell'ossigeno, inducono i sistemi di risposta del globulo rosso a modificare il ciclo di generazione di 2,3-DPG, aumentandone la produzione.

Questo avviene tramite un ciclo (ciclo di Rapaport) a loop accanto all'1,3-DPG e 3-PG che porta alla formazione di 2,3-DPG, le cui mutasi sono sensibili ai livelli di ossigeno e quindi modulano la loro attività a seconda della concentrazione di ossigeno interna all'Eritrocita.

Quando si ritorna ad altitudini inferiori si ha una forte eliminazione urinaria di fosfati perché il 2,3-DPG viene bloccato nella sua produzione ed eliminato sotto forma di fosfati (meccanismo sfruttato da atleti che fanno allenamenti in altura, per aumentare la resa e lo stimolo eritropoietico).

Il 2,3-DPG è più concentrato nei globuli rossi più giovani.

La capacità di trasportare l'$O_2$ dipende anche dal tipo di Hb: ad esempio Hb-F ha una maggior affinità per l'ossigeno rispetto all'Hb-A. Questo perché deve captare $O_2$ dall'Hb materna attraverso un meccanismo di diffusione (non c'è commistione tra il sangue materno e quello fetale). Ciò può avvenire solo se c'è la capacità di attrarre $O_2$ da parte dell'Hb-F maggiore.

Anche la temperatura influisce, infatti negli stati febbrili noi abbiamo un maggior consumo di ossigeno.

La cooperatività è la facilità con cui ciascuna delle 4 subunità induce un aumento di affinità per l'$O_2$ nelle altre. Passando dallo stato "ossi" allo stato "deossi", l'Hb subisce una modificazione conformazionale (rotazione di 15 gradi dell'asse principale).

Nel sangue a pH 7,4 e temperatura 37 °C, l'azione di tutti i meccanismi visti, corrisponde a una P50 di 26 ± 2 mmHg. Ciò significa che, in un soggetto normale, 100 ml di sangue rilasciano da 4 a 5 ml

di $O_2$ quando la $PO_2$ del sangue scende da 100mmHg a 40mmHg. Da tener presente che non viene rilasciato tutto l'ossigeno in questione, quella è la capacità totale, in realtà nel nostro sangue resta una riserva, fino anche a valori inferiori a 30mmHg.

La diminuzione del valore si traduce in un segnale di ipossia al rene con rilascio di eritropoietina.

*[schema NdR]*

In figura è proposto un quadro riassuntivo dell'andamento della respirazione polmonare. La parte pendente della curva è associata a quei valori sotto i quali non si dovrebbe scendere. È chiamato "limite d'allarme", corrisponde a 75-80% di saturazione.

[*altro grafico*]

Nell'immagine sono posti a confronto l'andamento dell'affinità per il proprio ligando di un trasportatore monomerico, come la Mioglobina, ed un trasportatore tetramerico, come l'Emoglobina. Una differenza fondamentale è il comportamento nel rilascio di ossigeno che è molto progressivo nel caso dell'emoglobina, mentre è estremamente rapido nel caso della mioglobina. La mioglobina si satura anche a basse pressioni di ossigeno, fino a 10 mmHg, dopo di che si ha una rapidissima (desaturazione NdR).

Questo è funzionale alla posizione della mioglobina, che è contenuta nel tessuto muscolare e funge da deposito di riserva per l'ossigeno. Qualora questo venisse esaurito si possono generare crampi muscolari.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 21/3/2013 (1)

---

MEDICINA DI LABORATORIO.

Lezione del 21 marzo 2013

Professore: G. Poli

Sbobinatore: Claudia Rossati

Revisore: Alessia Pretto

**FISIOPATOLOGIA DELL'EMOSTASI**

Quando una persona si taglia il sangue non continua ad uscire ma coagula.

La coagulazione è quel meccanismo, formato in realtà da una serie di meccanismi complessi, che quando uno dei nostri vasi si danneggia serve ad evitare che dal nostro albero vascolare esca

tutto il sangue contenuto, ma che si metta un tappo al buco che si è creato per impedire che il soggetto vada incontro a un problema di eccessivo sanguinamento : emorragia.

Ci sono una serie di meccanismi complessi che entrano in gioco per permettere che questo fenomeno si verifichi.

**Il termine emostasi va a descrivere questa serie di meccanismi complessi interagenti tra loro, che servono a garantire che a fronte di un danno alla parete di uno dei nostri vasi, non ci sia eccessiva uscita di sangue e quindi emorragia**. Quindi si ha emostasi fisiologica quando il sangue coagula nel sito di un danno vascolare.

Lo scopo è preciso e limitato: **bisogna infatti impedire il sanguinamento e contemporaneamente permettere il fluire dal sangue perché se l'arresto del sanguinamento comportasse l'arresto anche del flusso di sangue si avrebbe il problema della trombosi.**

Se il coagulo che si forma blocca il flusso del sangue, parlando ad esempio di un' arteria e del territorio irrorato da questa arteria, si va incontro a problemi legati alla mancanza di ossigenazione e quindi ad ischemia. Questo è quello che succede ad esempio nell'infarto.

Ma i meccanismi che entrano in gioco anche nell'infarto, sono gli stessi che entrano in gioco nella formazione del normale coagulo ma è la regolazione dei meccanismi che risulta alterata.

Vedremo quali sono i meccanismi, cercheremo di capire come entrano in azione e capiremo come gli stessi meccanismi sono alla base del normale fenomeno dell'emostasi ma possono essere alla base anche di trombosi, la quale può essere considerata un'estensione patologica di quello che è il normale meccanismo emostatico. Problemi a livello patologico insorgono quando i meccanismi di regolazione dell'emostasi non sono più ben controllati.

Dall'altro versante ci sono poi delle patologie emorragiche: ci sono soggetti che vanno incontro con molta facilità a problemi emorragici, perché in questi soggetti lo squilibrio fa sì che, a fronte di un danno vasale ci sia una eccessiva fuoriuscita di sangue.

L'emostasi, e di conseguenza le patologie ad essa correlate, è spesso paragonata ad una bilancia in cui su un piatto vengono poste le forze che tendono a sbilanciare l'equilibrio in senso trombotico e sull'altro le forze che tendono a sbilanciare in senso emorragico.

La normale emostasi è paragonabile alla commedia brillante in cui tutti gli attori entrano in scena al momento giusto, recitano bene la loro parte, fanno bene il loro ruolo e quindi nel teatro in cui avviene l'emostasi si ha la commedia brillante che porta al fine voluto, cioè evitare eccessiva fuoriuscita di sangue.

I fenomeni emorragici e le trombosi si possono paragonare alla commedia che diventa tragedia, non più brillante. La commedia non è più brillante perché qualcuno degli attori che deve entrare in scena non c'è, non entra in scena al momento giusto, non recita bene e quindi quella che doveva essere la commedia brillante diventa tragedia.

Gruppo di attori coinvolti:

1. **Parete vasale:** endotelio e sottoendotelio.

Nella parete vasale dobbiamo distinguere le strutture della parete, le cellule endoteliali, cioè il monolayer che riveste all'interno i nostri vasi e le costituenti sottoendoteliali che si trovano appunto al di sotto dell'endotelio.

2. **Piastrine:** che sono celluline che circolano nel sangue e il loro ruolo è fondamentale nei fenomeni coagulativi. Da un lato il difetto funzionale delle piastrine (o una carenza) e dall'altro un'iperattività piastrinica, possano essere nel primo caso fonte di problemi emorragici e nel secondo di problemi trombotici.

Quando il sangue fuoriesce dal vaso, esso coagula.

La **coagulazione** consiste di una serie di reazioni date dal fatto che da proteine inattive si formano enzimi attivi che poi hanno una reazione a cascata (cascata coagulativa) . Alla fine della cascata si forma la fibrina che va a bloccare il sangue.

La **fibrina** può incarcerare dei globuli rossi all'interno del reticolo che si forma e quindi si formerà un **trombo** rosso o se invece è formato solo da fibrina si parla di trombo bianco.

Questa serie di enzimi che reagiscono a catena sono definiti **fattori della coagulazione** e sono denominati con numeri romani.

Affinché le reazioni a catena rimangano localizzate dove servono, è necessario che siano presenti altri attori: gli **inibitori della coagulazione,** cioè altre proteine il cui compito è tenere sotto controllo quello che fanno i fattori coagulativi. Questi inibitori tengono localizzate le reazioni dove servono e fanno si che non si espandano. Se questo succede avremmo eccessiva coagulabilità che poi sfocia nella trombosi.

Quando si forma il trombo si forma un tappo che impedisce l'uscita eccessiva di sangue, ma quando il tappo ha svolto la sua funzione deve essere rimosso.

Alla fine del processo emostatico interviene un'ulteriore serie di proteine che nel loro insieme vanno a costituire il **sistema fibrinolitico** con la funzione di andare a rimuovere il coagulo che si è formato in modo che non ci siano ostruzioni che impediscano il flusso del sangue.

Parete vasale, piastrine e fattori della coagulazione portano alla formazione di un tappo che è stabilizzato da fibrina.

La fibrina viene poi rimossa dal sistema fibrinolitico e gli inibitori servono a tenere localizzato tutto questo processo nel sito dove c'è il danno per far si che non diventi un problema sistemico: affinchè l'emostasi sia fisiologica c'è la necessità che avvengano queste reazioni nel sito di danno, nel momento giusto (finchè è necessario, non devono protrarsi oltre il dovuto) e con la giusta estensione.

Andando in carenza o in eccesso *(di fattori ndr)* la bilancia si squilibra e si va o verso l'emorragia o verso la trombosi che sono situazioni in cui c'è perdita o mancanza di controllo.

Queste sono situazioni potenzialmente catastrofiche per il paziente perché un'emorragia massiva porta alla morte così come una trombosi o quelle che sono le configurazioni cliniche della trombosi (infarto, ictus).

**Alterazioni della coagulazione in senso ipercoagulante danno trombosi, in senso ipocoagulante emorragie.**

La funzionalità o meno delle piastrine e dei vasi possono contribuire a bilanciare nelle due direzioni.

I libri tendono a dividere questo processo in atti (primo e secondo), cioè si parla di **emostasi primaria ed emostasi secondaria** (n qualche caso si parla anche di emostasi terziaria). In realtà la commedia non ha pause, cioè un intermezzo tra primo e secondo atto ma è un continuum. Quindi la suddivisione in emostasi primaria e secondaria ha senso per identificare gli attori, ma è tutto un continuum e bisogna che sia così.

Quando si ha **trauma** ad un vaso, quello che succede è che viene esposto tessuto connettivo sottoendoteliale che è altamente trombogenico. Ciò significa che provoca **adesione e** successiva **attivazione** delle piastrine, la loro **aggregazione** e la formazione di un tappo. L'attivazione delle piastrine è accompagnata da un cambiamento della loro forma, da rilascio di sostanze che sono contenute all'interno delle piastrine stesse e dalla formazione di un tappo in seguito ad aggregazione.

Questa serie di eventi che riguardano il vaso da un lato e le piastrine dall'altro viene definita **emostasi primaria o fase vasopiastrinica**.

Quando c'è un danno nella parete, dal sottoendotelio emergono delle sostanze che sono il collagene e il von Willebrand. Le piastrine che in condizioni normali hanno un'attività nulla, presentano però dei recettori sulla loro superficie. Questi recettori riconoscono queste due sostanze e anche altre *(che il professore non cita, ndr)* e vi si attaccano.

Una volta che una piastrina si è attaccata, si attiva buttando fuori sostanze dai granuli (come ad esempio ADP, TXA2). Queste sostanze sono sostanze attivarci della piastrina stessa e richiamano altre piastrine.

La piastrina che si attiva espone inoltre un altro recettore che nella piastrina resting non è espresso. Questo ulteriore recettore è detto recettore IIb/IIIa ed  è il recettore per il fibrinogeno.

Il fibrinogeno è una molecola dimerica che ha quindi struttura "simmetrica"e viene legato da un recettore di una delle piastrine e dal recettore di un'altra piastrina.

Questo fa sì che queste piastrine si uniscano. Si forma così **l'aggregato piastrinico**, cioè le piastrine restano

legate tra di loro perché il recettore IIb/IIIa di una piastrina lega una delle due subunità del fibrinogeno, un'altra piastrina lega l'altro e quindi si uniscono assieme. Si forma così il tappo.

Un altro esempio: quando c'è un alluvione e si rompe un argine di un fiume, per contenere l'acqua che esce, si impilano dei sacchetti di sabbia. Però per avere una cosa più solida serve un legante. Interviene a questo punto **l'emostasi secondaria** nel senso che simultaneamente a quando si forma il tappo di piastrine legate tra di loro solo grazie al fibrinogeno, avviene una reazione a cascata che parte dall'attivazione di uno dei fattori della coagulazione tramite una sostanza contenuta nel tessuto sottoendoteliale, cioè il fattore tissutale. Questa cascata fa sì che il fibrinogeno venga trasformato in fibrina che funge da collante.

A questo punto il coagulo ostacola l'uscita di sangue perché è maggiormente consolidato e questo avviene appunto tramite una reazione a cascata che vede come ultima fase la trasformazione del fibrinogeno in fibrina.

All'interno del reticolo di fibrina possono rimanere inglobati dei globuli rossi e quindi a seconda della loro quantità il trombo può apparire anche visivamente rosso, oppure bianco se non ce ne sono.

Gli inibitori dei fattori della coagulazione fanno sì che il processo rimanga limitato. Se il coagulo si espandesse troppo e occludesse il vaso ovviamente avremmo un blocco al flusso del sangue. L'intervento degli inibitori della coagulazione fa sì che il processo agisca in uno spazio limitato per impedire la fuoriuscita di sangue ma non per occludere il vaso.

La struttura della parete vasale contiene varie sottostrutture; questa comprende oltre a endotelio e sottoendotelio anche una componente muscolare (muscolo liscio). A fronte di un danno vascolare si ha vasocostrizione involontaria e dalle cellule che vanno incontro a danno, vengono rilasciate sostanze con funzione vasocostrittrice. Questa vasocostrizione iniziale serve a delimitare l'ampiezza del danno e a far rallentare il flusso del sangue all'interno del vaso.

Il rallentamento del flusso all'interno del vaso fa sì che le cellule presenti nel sangue vadano più vicino alla parete e si favorisce l'interazione (ad esempio delle piastrine con il sottoendotelio).

Questa vasocostrizione è aiutata nel momento del prelievo di sangue a un paziente, esercitando una pressione nel punto in cui si era inserito l'ago dopo averlo estratto. Questo favorisce che il sangue si fermi prima.

Questa componente muscolare liscia entra in azione nei due casi visti sopra ma può anche entrare in azione in altre situazioni in cui ci sia comunque alterazione della parete vasale, come problemi ateromasici.

In questo specifico caso una delle problematiche che scatta è quella che sbilanciandosi in senso vasocostrittore la produzione delle sostanze, a quel punto ci sia anche un peggioramento della situazione che poi dà delle manifestazioni che precedono il vero e proprio momento trombotico. Ad esempio nell'angina ci sono queste vasocostrizioni.

## RUOLO DELL'ENDOTELIO:

Un ruolo fondamentale nei fenomeni coagulativi e dell'emostasi è dato dall'endotelio.

L'endotelio è il monolayer di cellule che riveste i vasi all'interno. Per lungo tempo si è pensato all'endotelio come ad una pellicola di cellophane che rivestiva le pareti vasali per evitare l'uscita di

sangue. In realtà l'endotelio ha un ruolo attivo, non è inerte. Svolge anche un ruolo di barriera tra intra ed extravaso ma non lo fa in modo passivo. Quelle che compongono l'endotelio sono cellule attive, in grado di produrre sostanze. Sulla superficie di queste cellule sono presenti proteine che hanno un ruolo fondamentale nella regolazione dei meccanismi emostatici. Hanno ruolo nell'infiammazione e nel permettere la fuoriuscita dai vasi verso i tessuti, delle cellule dell'albero vascolare.

Estensione dell'endotelio: 4-7 km^2.

L'endotelio inoltre ha un ruolo nella determinazione delle forze emodinamiche, nella regolazione del tono vasale e nella gestione della coagulazione.

In **condizioni basali,** l'endotelio ha fenotipo antitrombotico, antiinfiammatorio, antiaterogenico, anticoagulante e profibrinolitico.

Se l'endotelio si altera, si altera anche il fenotipo e quest'ultimo può diventare protrombotico, proinfiammatorio, proaterogenico e procoagulante.

Anche le sostanze prodotte dall'endotelio normalmente funzionante e dall'endotelio disfunzionale sono diverse.

L'endotelio può subire l'influsso di varie sostanze o di vari meccanismi.

Un disordine dell'endotelio può essere dato da fattori emodinamici: quando un soggetto ha la pressione alta, l'endotelio è sottoposto al cosiddetto shear stress cioè stress da flusso (specie dove ci sono biforcazioni nei vasi), il quale altera l'endotelio che diventa disfunzionale.

Se ci sono infezioni batteriche o virali, se ci sono tossine, se ci sono meccanismi infiammatori come formazione di immunocomplessi, l'endotelio diventa disfunzionale. I derivati del tabacco minacciano l'endotelio in senso disfunzionale. Quando l'endotelio diventa difunzionale può essere il punto di partenza di processi che portano alla trombosi. Queste sono ad esempio l'ateroembolia, aggregati piastrinici che poi si staccano e vanno a valle.

Esistono tuttavia meccanismi antitrombotici. Gli inibitori naturali della coagulazione sono delle proteine.

C'è infatti il **sistema dell'antitrombina** che va a inibire prima di tutto la trombina cioè il fattore II attivato *(fattore IIa, ndr),* ma oltre che agire contro la trombina, l'antitrombina disattiva altri due fattori della coagulazione cioè il fattore Xa e IXa. Perciò il sistema di controllo inibitorio dato dall'antitrombina va ad agire a livello di diversi fattori attivati.

L'antitrombina funziona perché sulla parete delle cellule endoteliali vengono esposti dei glicosaminoglicani (GAG), detti sostanze eparin-like (cioè sono simili all'eparina, la quale viene usata come farmaco anticoagulante). Interagendo con i GAG, l'antitrombina diventa mille volte più attiva che in condizione resting e quindi inibisce questi fattori della coagulazione.

Un altro sistema anticoagulante naturale è quello della **proteina C della coagulazione** (non è la proteina c reattiva), che ha come cofattore la proteina S.

Il sistema della proteina C si attiva perché, quando si forma trombina, sull'endotelio troviamo un'altra proteina chiamata trombomodulina. Quando la trombina si lega alla trombomodulina, invece di avere un'attività procoagulante ha un attività inibitoria della coagulazione perché il complesso trombina-trombomodulina va a attivare la proteina C attivata.

La proteina C attivata disattiva due fattori importanti per coagulazione che sono Va e VIIIa.

Per disattivarli, la proteina C li taglia a livello di un aminoacido specifico che è Arg in posizione 506 per il fattore V.

La mutazione al fattore V di Leiden (dal nome della città olandese) è un polimorfismo nella sequenza del fattore V che fa si che a livello della posizione 506 al posto dell'arginina ci sia un altro amminoacido. La proteina C non può quindi tagliare in questo sito ed il fattore V rimane attivo.

Il soggetto con questa mutazione non ha controllo sulla coagulazione e quindi si parla di ipercoagulabilità, ovvero il soggetto ha uno sbilanciamento in senso protrombotico.

Inoltre l'endotelio produce sostanze che non sono solo vasoattive e quindi vasodilatatrici, ma le stesse sostanze come ad esempio NO o PGI2, hanno anche attività inibente l'attivazione piastrinica.

Un normale endotelio si mantiene quindi in stato antitrombotico grazie a vari meccanismi.

Ma l'endotelio è anche punto di partenza di quella che deve essere la reazione finale di rimozione del coagulo che è la **fibrinolisi**, nel senso che lo stesso endotelio produce **l'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA)** che è la molecola che si trasforma in plasmina e che ha il ruolo di lisare la fibrina per rimuovere il coagulo.

Riassumiamo il ruolo dell'endotelio:

- regolatore dell'aggregazione piastrinica
- regolatore della coagulazione e della fibrinolisi
- barriera
- regolazione tono vasale
- angiogenesi
- Regolatore della permeabilità e della diapedesi

Non è una pellicola impermeabile, ma è un tessuto attivo con ruoli importanti.

Un endotelio normale ha un fenotipo inibente la coagulazione, vasodilatatore e inibente le reazione di aggregazione piastrinica.

Invece l’endotelio disfunzionale ha fenotipo opposto e quindi favorisce fenomeni alla base di tutte la patologie cardiovascolari. La disfunzione endoteliale infatti è messa al centro di tutti quelli che sono i meccanismi di trombosi, infiammazione, vasocostrizione e rottura della placca aterosclerotica che sono alla base di queste patologie.

La diminuzione dei mediatori vasodilatatori, l’aumento di quelli vasocostrittori; l’aumento di sostanze procoagulanti e la diminuzione di sostanze anticoagulati giustifica perché a fronte di aumento pressorio, di iperlipidemia e stress ossidativo questo si manifesti clinicamente con patologie cardiovascolari.

**SOTTOENDOTELIO:**

Il sottoendotelio contiene sostanze che vengono esposte in seguito a danno vascolare, come ad esempio fvw e collagene. Queste sono due sostanze che fungono da ligandi per recettori piastrinici e quindi sono alla base dell’inizio dell’adesione delle piastrine al sottoendotelio. Oltre a queste due principali sostanze ce ne sono altre, ossia proteine che favoriscono l’adesione. Bisogna tenere conto che normalmente queste non sono esposte all’interno del vaso perché al di sopra di esse c’è lo strato di cellule endoteliali. Ecco che quando questo monostrato viene rotto o si sfalda, queste sostanze vengono esposte all’interno del vaso e vengono riconosciute dalle piastrine. Le piastrine aderiscono, si attivano, richiamano altre piastrine, si aggregano e si forma il tappo piastrinico dell’emostasi primaria.

**PIASTRINE:**

Sono una forma cellulare incompleta e derivano dai megacariociti. Se guardiamo al microscopio elettronico una piastrina, la vedremo in forma discoidale quando è in stato resting.

Guardando all’interno di una piastrina vediamo diverse strutture come strutture canalicolari di superficie, dei granuli contenenti varie sostanze e mitocondri per il rifornimento energetico.

Le piastrine hanno diverse importanti funzioni.

Aderiscono ai siti di danno, generano mediatori biologici e servono da nido per le reazioni coagulative, infatti i fattori della coagulazione si attivano a cascata a livello della membrana piastrinica.

La piastrina, quando si attiva, va incontro a cambiamenti di forma. Passa da una forma discoidale e compatta, ma quando aderisce emette una serie di estroflessioni (sembra un polipo) che vanno ad attaccarsi al sottoendotelio. A questo punto, dopo l’adesione abbiamo l’attivazione, il rilascio di sostanze e il richiamo di altre piastrine che si attaccano l’una all’altra.

E’ possibile intervenire sull’aggregazione con una **terapia antiaggregante**.

-Acido acetilsalicilico

-Clopidogrel

La piastrina presenta sulla sua superficie vari recettori glicoproteici che mediano l'adesione:

-GpIb-IX lega il fvw (favorisce l'adesione)

-GpIa-IIa lega il collagene (favorisce l'adesione al collagene e innesca la cascata di attivazione delle piastrine a seguito della quale viene espresso il recettore IIbIIIa, che non è presente sulle piastrine resting.)

-GpIIb-IIIa lega il fibrinogeno il quale è dimerico e quindi viene legato da due piastrine (media l'aggregazione).

**PATOLOGIA PIASTRINICA:**

Patologie che si manifestano quando un attore della coagulazione non entra in scena per vari motivi.

-**Malattia di Von Willebrand**.

Pazienti con questa patologia mostrano tendenza al sanguinamento perché a seconda del tipo di patologia (tre tipi: 1, 2, 3) o non c'è il fvw (tipo terzo), ce n'è poco (tipo primo),o fvw non è funzionante (tipo secondo).

Uno dei ligandi a cui deve aderire la piastrina nel tipo terzo non c'è per cui questo paziente ha una diatesi emorragica di rilievo perché non c'è buona emostasi.

Fvw è un ligando del sottoendotelio per le piastrine, ma ha anche un altro compito in circolo: trasporta il fattore VIII e lo protegge dalla disattivazione. Quando non c'è fvw cala la quantità di fattore VIII perché và incontro ad una maggiore degradazione. Infatti se si guarda un esame del sangue che monitora la via intrinseca, nei pazienti con malattia di Von Willebrand c'è un allungamento dell'aPTT perché hanno livelli abbassati di fattore VIII.

-**Sindrome di Bernard Soulier**.

Il paziente non ha il recettore per fvw.

-**Tromboastenia di Glanzmann**.

Le piastrine non esprimono correttamente il recettore IIb/IIIa. Non è quindi possibile legare il fibrinogeno e di conseguenza non si ha adeguata formazione del tappo piastrinico. La tendenza è emorragica.

Riassunto delle funzioni delle piastrine:

-I recettori servono per l’adesione e l’aggregazione.

-La piastrina viene attivata da: ADP, TXA2, collagene ecc.

-Il clopidogrel è un farmaco antiaggregante.  é un inibitore del recettore dell’ADP, cioè inibisce la via per mezzo della quale questa sostanza attiva l’aggregazione piastrinica. Si ha blocco del recettore P2Y della piastrina e questo rende la piastrina insensibile all’ADP.

-L’acido acetilsalicilico, altro farmaco antiaggregante, blocca l’attivazione dell’acido arachidonico a formare il trombossano, che è un forte attivatore piastrinico. In questo modo la piastrina non si attiva. Si usa nel postinfarto. In un paziente con stent coronarico si somministra una doppia terapia cioè aspirina e clopidogrel per evitare aggregazione piastrinica a livello dello stent stesso.

Sulla superficie della piastrina si formano dei complessi multifattoriali (fattore VIII, fattore IX e fattore X). Il fattore X viene attivato, si forma un altro complesso formato da Xa e Va che attivano il fattore II.

VIIIa + IXa + X à Xa

Xa  + Va + II à IIa (trombina)

Tutte queste reazioni appartenenti alla cascata coagulativa avvengono a livello della membrana piastrinica.

I fattori della coagulazione sono delle proteasi che agiscono a cascata su proteine a valle inattive le quali vengono attivate. In condizioni basali anche loro sono inattivi e l’attivazione avviene secondo una reazione a catena o a cascata.

La cascata coagulativa è molto complessa. *(vedi immagini sulle slide. Io non ne sono in possesso. Il professore sottolinea che certe immagini rappresentano le vie intrinseca ed estrinseca come separate ma in vivo la situazione è più complessa. Indica inoltre che gli schemi più semplici, che rappresentano la coagulazione con via intrinseca ed estrinseca separate, servono per interpretare i risultati dei due test di coagulazione di base che vengono fatti in laboratorio, ndr)*

**TEST COAGULAZIONE** di base:

1- Il tempo di protrombina va a misurare la via estrinseca.

2- Il tempo di tromboplastina parziale attivata o aPTT và a misurare la via intrinseca.

Questi test verranno spiegati nel dettaglio nelle prossime lezioni.

In vivo l’attivazione della coagulazione è molto più combinata. Come abbiamo già detto, le reazioni di attivazione avvengono a livello della membrana piastrinica.

Come fanno questi fattori a legarsi alla membrana piastrinica?

Ci sono dei Gla domains nella struttura del fattore, i quali sono delle sequenze specifiche della proteina che devono essere gamma-carbossilati. Questa reazione richiede vitamina k (da koagulation, in tedesco). La vit. K serve per ritrasformare l’attività di questa gamma-carbossilazione.

C’è un farmaco usato nella terapia anticoagulante che è il Coumadin (usato anche come veleno per topi) che blocca la vit. K nello stato ossidato. Il risultato è che i fattori della coagulazione, in seguito all’azione di questo farmaco, non possono più essere gamma carbossilati e quindi non posso più formare complessi in modo corretto e quindi ci si sposta verso una situazione di decoagulazione.

Questo meccanismo funziona perché si devono formare complessi multifattoriali. La formazione dei complessi a livello della membrana piastrinica serve per localizzare il processo dove serve, per amplificarlo per mezzo dell’aumentata concentrazione di substrati e prodotti a livello locale, per modularlo e per facilitare il controllo da parte degli inibitori.

Per formarsi questi complessi hanno dunque bisogno dei Gla domains, i quali devono essere gamma-carbossilati in presenza di $Ca^{2+}$, solo in questo modo possono stabilizzarsi sui fosfolipidi di membrana.

Es: si forma il complesso della protrombinasi: c’è la protrombina nello stato inattivo, il fattore Va e il Xa (proteasi). La proteasi taglia un pezzo della protrombina attivandola così a trombina.

La trombina attivata và a formare la fibrina da fibrinogeno.

Quando viene legata dalla trombomodulina a livello dell’endotelio, si trasforma in attivatore della proteina C attivata.

Nel paziente in Coumadin la gamma-carbossilazione è ridotta, questi complessi si formano meno bene ed il paziente risulta scoagulato.

Un danno alla parete vasale porta ad adesione e aggregazione piastrinica, con conseguente attivazione della coagulazione e formazione del vero e proprio coagulo di fibrina. Questo va ad attivare il sistema fibrinolitico. Ci sono sostanze eparin-like che si legano all’antitrombina, la quale forma un complesso con la trombina ma disattiva anche il fattore Xa e IXa. La trombina legandosi alla trombomodulina attiva il sistema della proteina C (che ha come cofattore la proteina S). Se c’è difetto di antitrombina ci sarà un difetto protrombotico. Lo stesso se ho difetto proteina C o S.

Se c’è un difetto del recettore piastrinico, si impedisce la formazione dell’aggregato e la tendenza sarà emorragica.

Se c’è un difetto di fattore VIII (emofilia A), non si attiva la coagulazione e quindi si hanno emorragie.

**SISTEMA FIBRINOLITICO:**

L'endotelio rilascia l'attivatore tissutale del plasminogeno. Il plasminogeno diventa plasmina che degrada la fibrina.

Anche questo processo deve essere controllato, perciò c'è una proteina plasmatica detta a2-antiplasmina che deve bloccare la plasmina libera di modo che non vada ad agire dove non serve.

Ci sono anche gli inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI).

Se ho difetto in uno di questi sistemi (l'attore non entra in scena), l'emostasi non è più fisiologica ma diventa patologica.

Eccessi di PAI sono una minaccia in senso pro trombotico perché bloccano la fibrinolisi.

Il fattore XII dà allungamento di aPTT in vivo. Un aPTT lungo non è sempre segno del fatto che un soggetto abbia un difetto emorragico. L'aPTT è lungo nel paziente emofilico e quello rappresenta un difetto emorragico. Nel caso del paziente con difetto del fattore XII, l'aPTT è sempre lungo ma la clinica di questo paziente non è emorragica. Al contrario c'è uno sbilanciamento in senso trombotico. Questo perché il fattore XII in vivo attiva la fibrinolisi. Chi ha un difetto di fattore XII ha una fibrinolisi poco attiva e quindi la manifestazione clinica in vivo è quella di una trombosi.

L'emostasi fisiologica da un lato deve preservare la non eccessiva fuoriuscita di sangue dai vasi, dall'altro lato deve garantire che la bilancia emostatica non si alteri né in direzione emorragica, né in direzione trombotica.

Ci possono essere patologie che la sbilanciano. Possono essere patologie geneticamente determinate, come ad esempio il difetto del gene per il fattore VIII nell'emofilia; oppure può esserci un'alterazione della parete vasale; anomalie del carico delle piastrine come nei vari difetti dei recettori piastrinici (ad esempio nella tromboastenia di Glanzmann); ci può essere una eccessiva attività fibrinolitica.

Se c'è un difetto di inibitore dell'attivatore del plasminogeno, il problema è che si rimuove il coagulo troppo velocemente prima che questo sia riuscito ad occludere.

E' possibile quindi operare una distinzione clinica nella valutazione di questi pazienti e quindi torna utile la differenziazione in emostasi primaria, secondaria e terziaria, come tempi diversi.

Un paziente che sanguina subito dopo un intervento chirurgico, è probabile che abbia un problema a livello della fase vasopiastrinica e/o coagulativa.

Invece se il sanguinamento interviene dopo un giorno dall'intervento, significa che il coagulo non si è stabilizzato bene. Ci può essere un difetto di fattore XIII o un'eccessiva fibrinolisi.

RIASSUNTO TERAPIA  ANTICOAGULANTE:

Clopidogrel: agisce sul recettore dell'ADP delle piastrine

Aspirina: inibisce l'attivazione della via dell'acido arachidonico

Eparina: mima le sostanze eparin-like contenute nella parete endoteliale, coinvolte nell'attivazione dell'antitrombina

Cumarinici: blocca la ritrasformazione della vit. K che è un cofattore necessario per una corretta gamma carbossilazione dei fattori della coagulazione.

DOMANDE:

*(Tranne la prima domanda, le altre non si sentono nella registrazione, ndr)*

1) Quali sono i criteri di scelta di un anticoagulante?

I criteri per scegliere un anticoagulante sono clinici. A fronte di patologie dove il meccanismo primario è quello dell'attivazione piastrinica, ad esempio nel postinfarto, il paziente viene messo in terapia antiaggregante ( negli stent coronarici si fa addirittura una doppia terapia antiaggregante).

Nel tempo sono cambiati gli approcci. Ad esempio nella fibrillazione atriale (alterazione del ritmo cardiaco) prima si dava antiaggregante ora si tende a dare anticoagulante per evitare la coagulazione di sangue stagnante nel cuore in quanto questi coaguli possono andare in circolo provocando ictus cerebrali se finiscono nel cervello.

2) *Non si sente la domanda.*

Se c'è un ateroma poi ci può essere rottura della placca. Quando succede, il primum movens è la formazione del trombo piastrinico. Il ruolo dell'aggregazione è importante dove l' endotelio è danneggiato. Lo stress del flusso sanguigno è più alto a livello delle biforcazione dei vasi e quindi ad un certo punto può portare ad un distacco del trombo.

*3) Non si sente la domanda*

Il rischio della somministrazione di anticoagulante è eccedere. La complicanza più grave per un paziente in terapia con coumadin è l'emorragia. Bisogna scegliere la terapia più indicata.

Il paziente allettato che non si muove ha stasi venosa. Il flusso è rallentato. Se in questi soggetti ci sono fattori di rischio non conosciuti (es mutazione fattore V), se la profilassi anticoagulante non

viene fatta il rischio è molto più elevato rispetto a paziente senza mutazione. La scelta è quella di essere efficaci. La scelta maggiore in profilassi post operatoria è quella di usare l’eparina. Vantaggi: è attiva subito, rapida, ha tempo di disattivazione rapido (utile se il paziente ha complicanze emorragiche, perché stoppando la terapia si può recuparare in fretta). Il coumadin invece è efficace dopo 4 o 5 giorni e si disattiva più lentamente. Questo perché i fattori della coagulazione hanno una certa emivita e quindi bisogna aspettare che si degradino i fattori già gamma-carbossilati. Quindi nel soggetto con trombosi venosa acuta, l’intervento immediato è quello di dare eparina.  Poi si fà un’embricazione con terapia basata su coumadin, cioè si dà per alcuni giorni eparina e coumadin contemporaneamente, quando il coumadin diventa efficace si smette l’eparina e si continua solo con coumadin.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 28/3/2013 (1)

---

MEDICINA DI LABORATORIO
28/3/2013

Sbobinatore: Gavioli Irene

Revisore: Schiavone Elisa

**LA COAGULAZIONE E I TEST DI LABORATORIO**

*(Riferito alla slide NdR)* E' il riassunto di tutti gli attori che entrano in scena nella commedia dell'emostasi, commedia che se finisce in maniera adeguata è brillante, ma si può trasformare in tragedia (emorragica o trombotica), se qualcuno degli attori non è entrato in scena o se qualcuno non recita bene la sua parte e quindi sbilancia la corretta funzionalità dell'emostasi; in senso **emorragico** ovvero favorendo l'uscita di sangue dai vasi; in senso **trombotico** eccedendo nei meccanismi che normalmente devono solo servire per tappare la falla costituita da un danno di un vaso. La trombosi si può infatti definire come un'attivazione patologica dei normali meccanismi emostatici.
Il sistema è complesso ed interrelato.
Il primo problema è che non esiste un test di laboratorio che riesca a valutare tutte queste cose assieme.
Il secondo problema è comprendere cosa significa fare un test di laboratorio e quale significato ha un test di laboratorio.

(*Riferito alla slide che rappresenta un flow chart – un diagramma di flusso – che prende in considerazione il processo che va dalla decisione all'interpretazione di un'analisi di laboratorio*)
Il valore aggiunto di un test di laboratorio è quello di avere un'informazione necessaria a prendere una decisione di tipo clinico, che a seconda della prospettiva in cui mi pongo può essere:

- fare diagnosi (ad esempio, comprendere il motivo per cui un paziente tende a sanguinare o ha trombosi),

- monitorare una terapia (ad esempio, controllo dell'efficacia di terapie anticoagulanti con dicumarolico o eparina, di terapie antipiastriniche, antiaggreganti)

- fare test di screening (ad esempio, prima di effettuare un intervento chirurgico)

- fare follow-up (ad esempio, seguire un paziente a cui è stata fatta diagnosi di emofilia A e che è sottoposto a terapia sostitutiva con fattore VIII, per controllare che questo non abbia sviluppato anticorpi contro il fattore VIII).

Quindi il risultato di un'analisi di laboratorio mi dà informazioni per prendere decisioni cliniche.

Ma devo tenere conto della clinica, del problema che ha il paziente, per scegliere quale esame di laboratorio svolgere. Il primo momento del flow chart è il cervello del medico.

Due strumenti importanti di fronte al paziente sono:

1) l'ESAME OBIETTIVO; mi fornisce importanti informazioni, ad esempio:
- se il paziente ha ematomi od emartro (versamento di sangue intraarticolare), caratteristici di difetti di fattori della coagulazione, allora richiedo il test per fattori della coagulazione
- se il paziente ha petecchie, manifestazione di problematiche piastriniche, allora richiedo il test per piastrine
altri esempi:
- in un paziente che ha problemi di trombosi non valuto un deficit di fattore VIII
- né in un paziente con problemi emorragici valuto la quantità degli inibitori della coagulazione, come l'antitrombina, la proteina C o la proteina S

2) l'ANAMNESI; non solo personale, deve tenere conto anche del momento in cui si manifestano i sintomi, ad esempio:
- se sanguino subito allora è un problema di tipo vasopiastrinico
- se il sanguinamento è tardivo allora è un problema di iperfibrinolisi o di un difetto della stabilizzazione della fibrina quindi un deficit del fattore XIII.

*Esempio di un caso clinico (riassunto NdR):*

Un campione di una paziente giunge al laboratorio di analisi.
Sono richiesti sia l'analisi dei fattori della coagulazione (quindi per un deficit della coagulazione), sia l'analisi di fattori protrombotici.
I fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti sono tutti bassi e il PT è allungato.
Probabilmente la paziente era una signora con problemi trombotici ed il deficit della coagulazione dipendeva dalla terapia antitrombotica a cui era sottoposta. Tuttavia, il medico richiedente non avrebbe dovuto richiedere tali analisi, perché per la diagnosi di trombofilia non erano informative!

Il laboratorio è in mezzo a questo flow chart, ma non è il solo determinante dell'informatività del risultato.
Altri fattori o variabili preanalitiche sono:

- concomitante terapia (ad esempio un trattamento con coumadinici riduce il valore dei fattori della coagulazione vitamina K dipendenti)

- concomitante infusione (per pazienti ospedalizzati) che può influenzare il risultato:
* direttamente: se il paziente sta facendo un'infusione di eparina questo altera il test della coagulazione
* indirettamente: se il paziente sta facendo un'infusione di soluzione fisiologica, anche se questa non altera di per sé i valori della coagulazione, determina una diluizione del sangue e quindi del prelievo

- prelievo idoneo: il dato che fornisce deve essere informativo dello stato del paziente
* non deve subire la difficoltà del prelievo
*(se il prelievo è difficoltoso avrà una minore qualità NdR)*
* non deve trascorrere troppo tempo fra il prelievo e l'esame
* non devo scambiare il prelievo di diverse persone
* sede del prelievo
*(ad esempio, se un paziente è sottoposto a terapia eparinica endovenosa è meglio svolgere il prelievo lontano dalla sede di infusione – se infondo in una vena centrale, prelevo da una vena periferica)*

Il laboratorio deve garantire che il **risultato** che fornisce abbia una qualità analitica, ovvero che sia simile al vero o **AFFIDABILE**.
Ad esempio, se il laboratorio non è accurato nel determinare il valore del fattore VIII:
- se il valore reale è 50% e il valore del laboratorio varia fra 48% e 52% non ho problemi perché dal punto di vista clinico è la stessa cosa

- se il valore del fattore VIII scende sotto l'1% devo conoscere il dato esatto, perché trattasi di un'emofilia grave che deve essere trattata, calibrando la quantità giusta di fattore VIII da somministrare.

Il dato deve essere inoltre **INTERPRETABILE**.

Il range di riferimento è un parametro statistico che definisce come un valore si distribuisce nella popolazione normale. La distribuzione gaussiana di un dato viene definita normale. Quindi gli intervalli di riferimento vendono definiti normali perché vengono presi facendo una distribuzione normale dei risultati in una popolazione. Ma normale non significa non patologico, quindi un valore normale può essere patologico.

Il caso più eclatante in termini di laboratorio è la creatinina. Infatti l'intervallo di riferimento per la creatinina è molto ampio, nel maschio adulto può variare da 0,6 a 1,2 o addirittura 1,3 mg/dl. E' importante notare che 1,2 mg/dl è il doppio di 0,6 mg/dl, ma il valore è sempre considerato normale *(nel risultato delle analisi non c'è l'asterisco che segna un valore fuori dall'intervallo di riferimento).* L'intervallo di riferimento è molto ampio perché la concentrazione dipende da altri meccanismi, ovvero dalla massa muscolare del soggetto. Per cui è normale, nel senso di non patologico, che un soggetto mingherlino abbia valori pari a 0,6 mg/dl; mentre per un body builder non è normale o non patologico avere un valore di 0,6 mg/dl. Il body builder infatti tenderà ad avere valori sopra 1 – 1,2 mg/dl, valori già patologici per un soggetto mingherlino.

Un dato deve anche essere **DISPONIBILE.**
Se il paziente sanguina e il test che mi determina la patologia necessita di 48 h, devo comunque somministrare una terapia prima.

Quindi questo flow chart *(riferito alla slide, NdR)* riassume tutto quello che sta dietro un esame di laboratorio:
1) scelta dell'esame giusto, ovvero quello che mi dà maggiori informazioni per la problematica che ha il paziente (ovvero diagnosi, screening, monitoraggio della terapia, follow-up)

2) idoneità del campione, corretta esecuzione del prelievo (dipendente dal personale sanitario, dagli infermieri)

3) analisi da parte del laboratorio di riferimento (nei pazienti in TAO, ovvero che prende il Coumadin, si guarda una delle due modalità di espressione del risultato del test che si usa per questi pazienti, ovvero il tempo di protrombina (PT), ovvero non uso il ratio ma l'INR)

4) corretta interpretazione dell'intervallo di riferimento normale.

Nel campo dell'emostasi e della coagulazione il ruolo del laboratorio è quello di dare supporto alla diagnosi delle patologie emorragiche, da un lato, e trombotiche, dall'altro.

Ad esempio, è nelle linee guida delle varie società scientifiche:
- il test per il fattore di von Willebrand nelle pazienti che hanno tendenze ad avere problemi di menorragia (ovvero flusso mestruale abbondante);

- il test di trombofilia in pazienti con problematiche trombotiche o con aborti spontanei ripetuti (fattori di rischio trombofilico sono cause di aborti spontanei ripetuti);

- il test per l'eparina per monitorare i pazienti in TAO (sarà necessario comprendere come monitorare nuovi farmaci anticoagulanti che inibiscono la trombina che stanno per uscire);

- i test di monitoraggio per terapie sostitutive con il fattore VIII o con fattore di von Willebrand per sapere se i valori corretti sono stati ripristinati e le problematiche emorragiche sono state eliminate;

- i test preoperatori: anche per problematiche medico-legali è necessario che vengano svolti dei test.

- i test per soggetti con fattori di rischio familiari (ad esempio se un paziente ha episodi familiari di trombosi e richiede di prendere la pillola è opportuno svolgere opportuni test prima – poiché la pillola è un fattore di rischio protrombotico).

Non ci sono test globali.
Quindi è necessario mettere insieme informazioni da test diversi.
E' necessario interpretare in modo corretto il fatto che un paziente abbia PT alterato e aPTT non alterato, o viceversa *(il PT valuta la via estrinseca, mentre l'aPTT valuta la via intrinseca, NdR).*
Proprio perché il sistema è complesso, la separazione dei test può non aiutarmi ma portarmi a perdere l'informazione che in realtà dovrei trarre.

(Riferito a slide che mostra le linee guida per i prelievi, NdR)

Il prelievo deve essere eseguito in un determinato modo:
- il laccio emostatico non deve essere mantenuto per più di 60 secondi;

- è meglio fare il prelievo con un ago più grosso della farfallina perché altera meno la coagulazione (sebbene sia più facile eseguire il prelievo con la farfallina);

- il sangue non deve essere coagulato. Nelle provette usate per il test di coagulazione (generalmente quelle con tappo azzurro) è presente un anticoagulante, ad esempio il sodio citrato. E' importante la quantità di anticoagulante e quella di sangue; esse devono essere in rapporto corretto, ovvero 9 parti di sangue e 1 di anticoagulante. Quindi devo riempire adeguatamente la provetta, aspettando il tempo corretto, il fatto che la provetta sia sotto vuoto non è sufficiente a determinare un adeguato riempimento. Se il riempimento non è adeguato il laboratorio rispedisce la provetta con la dicitura "riempimento non corretto";

- il campione non deve essere emolitico. Se il prelievo viene svolto in modo difficoltoso, ad esempio da un ago cannula in cui sono presenti flussi di sangue strani *(turbolenti NdR),* i globuli rossi si rompono e il campione diventa emolitico, ovvero quando poi viene operata la separazione della parte corpuscolata del sangue dal plasma, quest'ultimo, invece che avere un colore paglierino,

assume una pigmentazione rossa dovuta alla presenza di emoglobina (fuoriuscita dai globuli rossi lisati). Questo può determinare un'alterazione del risultato;

- il campione non deve essere iperlipemico. Se il paziente è sottoposto a parenterale (ad esempio l'intralipid, che come dice il nome è ricca di lipidi) il campione può essere lipemico e quindi non è possibile ottenere risultati con un metodo ottico, ma solo con test meccanico;
- la temperatura e centrifugazione, che dipendono di più dal laboratorio, incidono sul risultato.
La coagulazione si attiva a freddo, quindi non devo esporre il campione al freddo.

Poiché non esiste un test globale, vengono eseguiti **test di screening**.

Combinando più test di screening possiamo arrivare ad un'informazione finale.

Ma quali sono i test di primo livello solitamente utilizzati per indagare la coagulazione e l'emostasi?
- *PT*, tempo di protrombina, una volta definito anche *tempo di Quick*

- *aPTT*, tempo di tromboplastina parziale attivata
- *conta delle piastrine* prima di tutto perché ci può essere un difetto quantitativo delle piastrine
- *tempo di emorragia* che valuta la fase dell'emostasi primaria vasopiastrinica
- test in vitro: inecitad1, anche definito *PFA*, che valutano sempre la fase dell'emostasi primaria
- *dosaggio del fibrinogeno*, che serve come ponte fra le piastrine e viene poi trasformato dalla trombina in fibrina
- *D-dimero*, un prodotto di degradazione del coagulo quando interviene la fibrinolisi.

## LA COAGULAZIONE

Solo nel secolo scorso si sono compresi bene i meccanismi della coagulazione.

All'inizio del '900 si conosceva l'esistenza di fibrinogeno, protrombina, tromboplastina e calcio.
Ci sono dei lavori di fine '800 inizio '900 che postulavano che quello che succedeva fosse questo (*riferito alla slide, NdR*).

E' stato Quick nel '35 a vedere, aggiungendo al plasma citratato calcio e tromboblastina (ovvero quello che facciamo ora per il PT), la cascata di eventi che porta alla formazione di fibrina.

Nel '47 si era valutato un caso di difetto del fattore V, quindi si notò che nella cascata della coagulazione fino ad allora individuata mancava questo fattore.
Nel '53 alcuni autori hanno proposto un altro test diverso dal tempo di Quick (o PT): il PTT, tempo di tromboplastina parziale, ovvero la tromboplastina che non contiene il fattore tissutale. Questo era un altro test che poteva spiegare perché il PT negli emofilici era comunque normale mentre l'aPTT risultava alterato.
Nel '59 si ha l'introduzione della numerazione romana per i fattori della coagulazione.
*(Riferimento alla slide in cui sono mostrati il fattore con il numero romano e la corrispondente molecola o proteina. Il professore nota solo come esempio che il fattore II è la protrombina, NdR).*

Nel '64 avvenne l'identificazione della cascata coagulativa, l'articolo comparve su Nature e dimostrava come la coagulazione fosse una serie di reazioni a cascata partendo dalla superficie di contatto. Ma anche questo schema della cascata coagulativa era incompleto, non si capiva come

certe reazioni avvenissero, che ruolo avessero il fattore VIII e il V (*sono coattivatori, NdR*) e che significato avesse il fattore VII (*appartiene alla via estrinseca, NdR*).

Nel '75 è stata introdotta la cascata coagulativa che tiene conto non solo della via intrinseca ma anche di quella intrinseca, cioè quella che parte dall'attivazione del fattore VII tramite il fattore tissutale.
Questo ha poi spiegato:
- la maggior rilevanza della via estrinseca in vivo,
- i meccanismi di feedback positivo che aumentano l'entità di questa reazione,
- l'esistenza di meccanismi inibitori di questa cascata.

L'attuale visione è quella di un sistema molto più complesso ed interrelato con dei meccanismi a feedback, che portano come meccanismo finale l'attivazione del fibrinogeno in fibrina, la sua stabilizzazione da parte del fattore XIII, attraverso meccanismi più complicati di quelli postulati inizialmente.

Resta escluso il fattore XII. In realtà si è compreso che, sebbene serva in vitro per attivare la coagulazione nell'aPTT (che monitora la via intrinseca), in vivo ha un'altra funzione che è quella di attivare la fibrinolisi.

Gli inibitori naturali sono:
- l'inibitore del fattore tissutale (TFPI, Tissue Factor Pathway Inhibitor)
- l'antitrombina che non inibisce solo il fattore II ovvero la trombina ma anche il X e il IX fattore

- l'eparine factor 2
- il sistema trombomodulina, proteina C, proteina C attivata che ha come cofattore la proteina S.

Dal punto di vista di laboratorio, lo schema del '75 della cascata della coagulazione divisa in due bracci cioè via intrinseca e via estrinseca serve per spiegare i due test di base ovvero l'aPTT e la PT. Esiste poi un terzo test che può essere utilizzato che è il tempo di trombina che misura l'attivazione direttamente in vivo della trombina.

<u>TEMPO DI PROTROMBINA (PT)</u>
In questo test, il sangue prelevato e contenuto all'interno della provetta con l'anticoagulante viene centrifugato ottenendo del plasma.
Quindi aggiungo calcio, poiché il calcio è necessario alla coagulazione e quello presente nel sangue è stato inibito dall'anticoagulante aggiunto alla provetta.
Quindi aggiungo tromboplastina, ovvero una lipoproteina, un complesso che contiene fosfolipidi e fattore tissutale.
A questo punto il fattore tissutale attiva il fattore VII e quindi ho l'attivazione della via estrinseca.
Il fattore VII attiva poi il fattore X grazie anche all'azione del fattore V (*via comune, NdR*) che a sua volta attiva il fattore II (*protrombina, NdR*) a trombina.

Le reazioni della coagulazione inoltre avvengono su una superficie di fosfolipidi, che in vivo è data dalla superficie fosfolipidica delle piastrine, in vitro è data dal fatto che la tromboplastina è

costituita da fosfolipidi. Questa reazione avviene quindi perché i fosfolipidi presenti nella tromboplastina agiscono da piattaforma su cui avvenga la reazione.

Quali possono essere le cause di un allungamento del tempo di protrombina? Un modesto o severo deficit di vitamina K. Perché si formino questi complessi plurifattoriali, infatti, i fattori devono essere γ-carbossilati, e la γ-carbossilazione richiede la vitamina K; di conseguenza, se ho un difetto di vitamina K i fattori sono meno γ-carbossilati, il complesso si forma meno bene e il risultato è che la coagulazione sarà più lenta.

Posso così misurare il tempo necessario alla formazione del coagulo, non occhiometricamente ma con uno strumento con un mezzo fotoottico, nel nostro caso (*ovvero nel laboratorio di Borgo Roma, NdR*), che fa passare luce attraverso la provetta nella quale avviene la reazione. La formazione del reticolo di fibrina determina una diminuzione del passaggio di luce che viene rilevato da un sensore sito dal lato opposto della provetta rispetto al mezzo fotoottico. Un algoritmo determina quindi quanto tempo è occorso alla formazione del coagulo.

L'espressione del risultato del PT può essere:
- in secondi, ovvero con il dato fornito dalla macchina (non più usato)
- come percentuali di attività (non più usato)

Ad oggi i risultati sono espressi come:
- rapporto di protrombina (ratio): ovvero il rapporto fra il tempo in secondi ottenuto dal campione del paziente e il tempo in secondi che considero normale (ovvero il range di riferimento ottenuto dalla distribuzione normale dei risultati dell'analisi di un centinaio di campioni provenienti da individui che non hanno problemi coagulativi).

Il problema con questo modo di espressione è che i risultati per i pazienti in TAO sono diversi da laboratorio a laboratorio. Questo perché il difetto indotto dal Coumadin passa attraverso la γ-carbossilazione e quindi la formazione di complessi sui fosfolipidi. Tromboplastine diverse *(ovvero il fatto che ogni laboratorio usasse una tromboplastina diversa, NdR)* evidenziano in modo diverso il difetto che veniva indotto, con il risultato che in alcuni casi il PT si allungava molto, in altri si allungava poco. Se quindi lo stesso paziente in TAO volesse risultati comparabili dovrebbe andare nello stesso laboratorio.
- questo problema venne risolto introducendo l'**Indice di Sensibilità Internazionale di tromboplastina** (**ISI**). Si è presa una tromboplastina internazionale di riferimento, e si è detto che, a fronte del difetto indotto da una terapia anticoagulante, l'allungamento deve essere così. I produttori di tromboplastine hanno recepito questo confronto con questa tromboplastina internazionale di riferimento e hanno determinato un indice di sensibilità della propria tromboplastina *(che è l'ISI usato nella formula, NdR).* Il risultato del ratio elevato alla ISI viene definito **INR** (**International Normalized Ratio**). Questo mi consente di avere INR uguali anche se i PT e i ratio sono diversi per effetto dell'utilizzo di tromboplastine diverse. Il vantaggio è che l'INR: consente il monitoraggio di pazienti in TAO anche in paesi (e laboratori) diversi, dovrebbe (perché in questo caso entrano in gioco anche altri fattori) consentire un miglior controllo della terapia e una comparabilità. Infatti ormai è standardizzato che per le varie patologie tranne che quelle delle valvole cardiache meccaniche, il range terapeutico (ad esempio per un paziente in trattamento con Coumadin) è fra 2 e 3 di INR, che garantisce la protezione del paziente dalle patologie protrombotiche e lo espone a minori rischi emorragici. Per quanto riguarda le valvole

cardiache meccaniche il range è un po' più alto: fra 2,5 e 3,5 di INR, perché il rischio tromboembolico è più elevato.

Cause di un ALLUNGAMENTO del PT:
- modesto o severo deficit di vitamina K, che γ-carbossila i fattori della coagulazione, garantendone l'interazione in un complesso. Se i fattori non sono γ-carbossilati la coagulazione è più lenta, perché occorre più tempo per l'interazione dei fattori, quindi il PT si allunga.
- terapie con dicumarolici

- malattie epatiche, perché le epatopatie causano una minore produzione di fattori della coagulazione. Il PT infatti è utilizzato come test di funzionalità epatica dagli infettivologi per seguire i pazienti con epatiti virali, perché il paziente che ha una grave compromissione epatica ha anche un PT allungato
- difetti di componenti della via estrinseca (fattore VII, X, V e II)
  * genetici: ad esempio difetto nel gene di uno dei fattori che porta ad una minore sintesi
  * acquisiti: ad esempio produzione di anticorpi che agisce come inibitore e blocca uno dei fattori
- eccesso di eparina (ma il PT non è il test elettivo per monitorare la terapia con eparina)

Cause di un ACCORCIAMENTO del PT:
- tutte le situazione protrombotiche, quando un soggetto ha un'ipercoagulabilità in vivo è già attiva la coagulazione, quindi in vitro il PT risulta essere accorciato
- in soggetti sottoposti ad alte dosi di estrogeno, attraverso un meccanismo complesso *(che il professore non spiega, NdR)*

- in situazioni preoperatorie quando c'è un'accentuazione di problemi infiammatori

- nel post-partum, poiché la donna per non sanguinare ha un'ipercoagulabilità
(il post-partum è la fase più a rischio per le proprietà trombotiche)
- infusioni endovena di fattore VII attivato in pazienti emofilici con emorragia in corso, che fa sì che si abbia un'ipercoagulabilità in vivo, quindi un PT molto corto in vitro.

TEMPO DI PROTROMBINA ATTIVATA (aPTT)

Anche in questo caso il plasma prelevato e centrifugato viene ricalcificato e viene aggiunto con la tromboplastina parziale, ovvero il complesso di fosfolipidi mancante di fattore tissutale.
Quindi aggiungo un attivatore della fase di contatto, poiché in assenza di TF la coagulazione non inizia. Infatti il reattivo dell'aPTT in realtà è un attivatore di superficie ovvero una molecola con una carica negativa (caolino, vetro, acido ellagico, silice micronizzata), che preattiva questa parte alta della via *(intrinseca, NdR)* e quando aggiungo calcio questa reazione mi parte. Quindi in questo caso la reazione parte quando aggiungo calcio e va a valutare la via intrinseca a partire dal fattore XII ma ancora più in alto dall'HMWK (High Molecular Weight Kininogen) e dalla precallicreina, fattore XI, fattore IX, VIII, X, V, II e fibrina. Dall'VIII (*ma il fattore VIII fa comunque parte della via intrinseca, NdR*) in poi sono gli stessi fattori che sono coinvolti nella via estrinseca e fanno parte di quella che viene definita via (pathway) comune.

Anche in questo caso i fosfolipidi sono importanti. Ci sono due gruppi di complessi multifattoriali che si devono formare: quello del IXa con l'VIII e il X e quello del fattore Xa con il V e il II. La via è stata così descritta già dal '53. *(Non è chiaro penso che abbia detto così, NdR)*

Cause di ALLUNGAMENTO dell'aPTT

- terapia con eparina (la più comune causa in un paziente ricoverato)
- inibitori Lupus-like, anticorpi che ricadono nell'autoimmunità, ovvero che sono prodotti dal soggetto contro strutture proprie, ovvero i fosfolipidi. Avere anticorpi anti-fosfolipidi presenti nel plasma del paziente causa un allungamento dell'aPTT. In questo caso l'allungamento non determina problematiche emorragiche ma i soggetti che hanno questi anticorpi hanno problematiche trombotiche, per cui è bene tenere a mente che un allungamento dell'aPTT non è solo segno di emorragia. La clinica deve sempre essere presa in considerazione: se il paziente con aPTT allungato non ha problemi emorragici ma trombotici, è probabile che abbia inibitori di tipo Lupus e studio proprio quello come step *(esame di laboratorio, NdR)* di secondo livello.

*Domanda:* perché gli inibitori Lupus-like danno problemi di trombofilia?
*Risposta:* non ho spiegato il meccanismo con cui danno questo problema. Gli anticorpi allungano questo test perché sono inibitori che vanno contro componenti fosfolipidiche. Una di questi componenti fosfolipidiche è la β2 glicoproteina 1. Bisognerebbe fare un discorso approfondito, ma richiederebbe una lezione a sé stante, sull'importanza della β2 glicoproteina 1 e sull'ulteriore differenziazione nell'ambito dei test del Lupus anticoagulante con test funzionali che si chiamano *LAC (test per il Lupus Anti Coagulante, NdR)* e con test che vanno a vedere la specificità anticorpale, l'epitopo verso cui è specifico l'anticorpo. Comunque in questi soggetti l'allungamento dell'aPTT è dovuto al fatto che gli anticorpi sono rivolti verso strutture fosfolipidiche che si mostrano anche a seconda della quantità di fosfolipidi presenti nel reattivo ma il meccanismo andrebbe più specificato *(il professore è disponibile a parlarne a ricevimento, NdR).*

- deficit di componenti della via intrinseca.
  * congenite: deficit genetico di fattore VIII (emofilia A), difetto genetico di fattore XI (emofilia B)
  * acquisite: emofilia acquisita (sviluppo di un anticorpo anti-fattore VIII, succede in persone anziane in terapia)

- malattie epatiche: poiché determinano una mancata produzione di fattori della coagulazione
- stati di consumo: la DIC (Coagulazione Intravascolare Disseminata) è una situazione in cui la coagulazione va fuori controllo. I sistemi inibitori della coagulazione servono a mantenere la coagulazione sotto controllo, quando la coagulazione sfugge da questo controllo si ha Coagulazione Intravascolare Disseminata, le reazioni di formazione del coagulo si attivano ovunque. Ci sono due tipi di problemi: emorragici da un lato, si ha un consumo, l'aPTT si allunga; ma il consumo determina la formazione di coaguli e quindi si ha un problema a livello di organi. Se si forma un coagulo che blocca l'arteria renale, il rene non riceve più sangue e questo porta a morte. E' la controparte di consumo di quello che non viene prodotto nelle malattie epatiche.

Cause di ACCORCIAMENTO dell'aPTT

- gravidanza, la donna ha una coagulazione più attiva in gravidanza per evitare di avere rischi di salute.
- situazioni che causino l'attivazione di fattori. Viene interpretato in assenza di fattori infiammatori d'altro genere, che sono la terza voce, il fattore VIII (che è una proteina di fase acuta). Il fattore

VIII aumenta in situazione di infiammazione. Quindi un aPTT accorciato può essere legato ad un aumento di fattore VIII a seguito di fenomeni infiammatori.
(Qualche medico ritiene che se e il paziente non ha fenomeni infiammatori, non è in gravidanza, ma ha comunque un aPTT corto, allora ha un aumentato rischio protrombotico, ovvero ha una coagulazione comunque attivata che è appunto uno stato pretrombotico.)

- fenomeni infiammatori
- controllo dell'eparina non frazionata. Ci sono studi a partire dagli anni '70 che mostrano come un prolungamento dell'aPTT serva a monitorare la terapia eparinica. Di solito si ritiene che un paziente in fusione con eparina non frazionata sia in corretto range di prolungamento dell'aPTT, se ha un ratio di 1,2-1,5 che corrisponde ad una concentrazione di eparina circolante pari a 0,2 – 0,4 unità/ml.

Questo test non va utilizzato per il monitoraggio di pazienti in terapia con eparina a basso peso molecolare (clexane, nadroparina). L'eparina a basso peso molecolare non aumenta l'aPTT, per cui il monitoraggio di un paziente in terapia con eparina non frazionata deve essere effettuato con un test che misura l'attività anti-Xa del cofattore dell'eparina II.

INTERPRETAZIONE DELL'ALLUNGAMENTO DEL PT e DELL'aPTT
- sono allungati entrambi?
- è allungato uno solo?
- come e quanto sono allungati?
- è necessario tenere conto della clinica. Ad esempio, un aPTT lungo in un paziente che non ha problematiche emorragiche ma ha problematiche trombotiche, porta a pensare al LAC (Lupus Anti Coagulante). Un aPTT lungo e un problema protrombotico portano a pensare a un deficit di fattore XII. Un aPTT allungato in un paziente con emorragia mi fa pensare a un difetto di fattore VIII o IX, cioè difetti di quei fattori che portano ad una diatesi emorragica *(una predisposizione emorragica, NdR).*

Come si può capire se il paziente ha un difetto o è presente un inibitore?
Si possono fare test di miscela: prendendo plasma del paziente e plasma normale e miscelandoli. Quindi basta svolgere il test sulla miscela, determinando aPTT.
Paziente con problema emofilico: l'aggiunta di plasma normale corregge l'allungamento. Anche se ho un valore molto basso di fattore VIII, la media risulta circa 50% di fattore VIII che è sufficiente a normalizzarmi l'aPTT.
Paziente che possiede un inibitore: la miscela dà comunque un aPTT che risulta prolungato. L'inibitore blocca anche il fattore VIII del plasma normale che è stato aggiunto.

*(Il professore mostra dei grafici di flusso in cui si mostrano esempi, tipo PT lungo ed aPTT normale – o viceversa – e quindi come posso giungere alla diagnosi o alla risoluzione del problema iniziale, svolgendo nuove indagini o test e tenendo conto della clinica, NdR)*

## LE PIASTRINE

Le piastrine sono prodotte dai megacariociti nel midollo *(osseo, NdR).*
Ovvero i megacariociti si trovano nel midollo e poi in circolo troviamo le piastrine.
Le piastrine non hanno solo un ruolo di emostasi e trombosi, ma hanno un ruolo importante anche in altre funzioni da tener ben presenti. *(Ma il professore si limita solo all'emostasi e alla trombosi, NdR).*
Nell'organismo umano le piastrine circolano in forma inattiva, con una certa forma, con determinati recettori esposti e altri non esposti. Una volta che la piastrina aderisce cambia forma.

L’emivita di una piastrina è di circa 7-10 giorni, restano circa 36 h nella milza (dove risiedono circa 1/3 delle piastrine).
In seguito a splenectomia si ha un aumento delle piastrine circolanti che normalmente sono 150.000-400.000 /$mm^3$. Il numero delle piastrine è legato ad un bilancio fra la produzione midollare, la componente che rimane a livello splenico e quella circolante che è circa il 70%. Quindi il bilancio è fra produzione, favorita dalla trombopoietina, e la distruzione delle piastrine.

Per decidere quale test di laboratorio svolgere bisogna valutare questi aspetti:
1) Un difetto di sanguinamento può essere legato alle piastrine. Il sanguinamento in un difetto piastrinico è immediato. Quindi già la storia di sanguinamento può essere un indizio che indirizza verso un difetto piastrinico.
2) L’esame fisico mi indirizza ulteriormente: il difetto piastrinico determina porpora. Difficilmente l’emartro o l’ematoma profondo dimostrano un deficit piastrinico, essi sono caratteristici per difetti dei fattori della coagulazione.
3) Ovviamente bisogna escludere preventivamente che il soggetto sia in terapia con farmaci che interferiscono. Una delle cause di disfunzione piastrinica può essere l’assunzione di un farmaco come i FANS (Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei). I FANS (qualcuno in particolare, quasi tutti in generale) hanno un effetto sulle piastrine *(riducono la formazione di TXA2 da parte della COX1, quindi favoriscono l’emorragia, NdR)*. Pure i farmaci antidepressivi hanno un effetto anche sulle piastrine, agendo sul re-uptake della serotonina. Quindi è importante raccogliere una chiara storia del paziente, anche per quanto riguarda i farmaci che sta assumendo.

Il test di laboratorio di studio delle piastrine può essere a scopo diagnostico di patologie congenite o acquisite di sanguinamento, ma anche per monitorare l’efficacia delle terapie antipiastriniche o per monitorare un’iperfunzionalità piastrinica.

Esistono diversi tipi di approccio:

1) la conta piastrinica fatta dagli emocitometri (gli strumenti di laboratorio che fanno l’emocromo); valutazione della trombocitopenia o piastrinopenia: esiguo numero di piastrine che determina la formazione di un tappo piastrinico limitato
(Fino ad una trentina di anni fa la conta piastrinica andava esplicitamente richiesta perché non era inclusa nell’emocromo. L’emocromo veniva allora chiamato SMA4, perché venivano forniti quattro parametri: ematocrito, emoglobina, globuli rossi, globuli bianchi.
Oggi facendo richiesta per l’emocromo viene fornita anche la conta piastrinica.)

2) valutazione della morfologia delle piastrine con striscio periferico
piastrine grandi che sono già predisponenti *(credo abbia detto così, NdR)*

3) test funzionali

DEFICIT DEL NUMERO DI PIASTRINE: TROMBOCITOPENIE

Cause:

1) diminuita produzione:
- patologie ematologiche che interessano il midollo

- leucemie
- processi mieloftiesici
- disordini mieloproliferativi
- farmaci
- chemioterapia

2) aumentata distruzione:
- problematiche autoimmuni
- DIC

DEFICIT QUALITATIVI DELLE PIASTRINE: TROMBOCITOPATIE
- difetti ereditari: sindrome di Bernard Soulier (difetto del recettore Gp IX), tromboastenia di Glanzman (difetto della integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$)
- difetti acquisiti:
  * pazienti uremici hanno un'alterazione della funzionalità piastrinica
  * farmaci

Il test di laboratorio può valutare la presenza di un difetto o l'aumentata reattività, che in questo caso viene considerata prodromica per problemi trombotici.

Nel paziente sottoposto a stent coronarico la terapia consigliata è una doppia antiaggregazione piastrinica per impedire che le piastrine occludano lo stent appena inserito.

Il test può quindi essere utile per diagnosticare una ipofunzionalità (che sbilancia in senso emorragico) o una iperfunzionalità (che sbilancia in senso trombotico).
*(Indicando nella slide un'immagine che raffigura delle petecchie, NdR)* Questa è ad esempio una manifestazione caratteristica di difetto piastrinico a livello cutaneo.

IL TEMPO DI EMORRAGIA
E' un test che indaga alterazioni dell'emostasi primaria, attraverso la formazione del trombo.
Come si fa?
Si prende lo sfigmomanometro, lo si mette al braccio del paziente, lo si gonfia fino a 40 mmHg e con uno strumento apposito (che non è niente altro che una lametta che va a tagliare la cute e va in profondità) si esegue una piccola incisione sul braccio del paziente. Ovviamente il sangue comincerà a fuoriuscire dalla ferita. Quindi si provvede asciugando il sangue con carta bibula senza rimuoverlo troppo, perché altrimenti il sangue non si fermerebbe più, e si misura il tempo necessario affinché smetta il sanguinamento a seguito della formazione del tappo piastrinico.

Perché uso un apposito strumento per effettuare il taglio?
Per avere una profondità di taglio il più possibile standardizzata.
Il test è però molto generico e soggetto a molte variabili, ad esempio la pressione che esercito sullo strumento per effettuare il taglio. Quindi è un test che deve essere anche standardizzato sull'operatore. Un'altra variabile è il soggetto a cui deve essere sottoposto il test e ad esempio lo spessore della sua cute.

*Quindi questo test è utile per definire se un soggetto ha problemi vasopiastrinici ma è legato a tante variabili.*

*Chi deve essere sottoposto a questo esame?*

*E' un esame che deve essere fatto se il paziente ha una tendenza emorragica che si sospetta possa essere di natura vaso-piastrinica, quindi difetto piastrinico o malattia di von Willebrand. Nella malattia di von Willebrand il vWF non è presente*

nel sottoendotelio, quindi caratteristicamente il tempo di trombina è allungato.

Il tempo di trombina è aumentato anche in pazienti che prendono farmaci antipiastrinici.
Quindi a che scopo si usa questo test? Per monitorare la terapia antipiastrinica o per far diagnosi di emorragia?
Se si deve fare diagnosi di emorragia è necessario chiedere al paziente, prima di sottoporlo al test, se abbia assunto farmaci antinfiammatori non steroidei almeno negli ultimi dieci giorni. Altrimenti il test potrebbe risultare alterato perché il paziente ha assunto un antinfiammatorio.
In conclusione, proprio per la variabilità del risultato legata all'operatore, questo non è più un test che viene utilizzato ampiamente (anche secondo quelle che sono le linee guida).

Questo test è utile solo quando è mirato. Ad esempio, nel caso si sospetti che un paziente possa avere la malattia di von Willebrand risulta utile eseguirlo.

## PFA (PLATET FUNCTION ASSAY)

Test in vitro, più standardizzato.

In questo test viene fatto scorrere il sangue del paziente. Dopo averlo messo in una determinata posizione dello strumento, un sistema di flusso fa fluire il sangue all'interno del capillare *(dello strumento NdR).* A monte di questo capillare è presente una membrana e ci sono due cartucce: una con collagene e ADP, l'altra con collagene ed epinefrina. Il collagene è uno dei ligandi dei recettori piastrinici, per cui le piastrine cominciano ad aderire. L'epinefrina e l'ADP sono due attivatori piastrinici. Il risultato è la misurazione del tempo necessario affinché il capillare si occluda (circa 110 secondi), valutando a tempi diversi cosa c'è nel capillare. *(Ovvero il capillare in cui il sangue viene fatto fluire è suddiviso in due porzioni, entrambe rivestite con membrane contenenti piccoli fori presenti al centro di ogni membrana. La prima porzione contiene collagene ed ADP e non è sensibile ai deficit piastrinici indotti dall'aspirina, la seconda contiene collagene ed epinefrina, ed è sensibile ai deficit piastrinici indotti dai FANS. L'adesione progressiva delle piastrine determina l'occlusione del vaso. NdR)*
Se il tempo rimane al di sotto di una soglia predeterminato significa che non ci sono problemi; se questo valore soglia viene superato significa che ci sono dei problemi.

Come detto, le due cartucce contengono una ADP ed una epinefrina. Nel soggetto che ha una normale funzione tutte e due le cartucce danno valori normali. Nel paziente che assume aspirina, poiché questa inibisce la via dell'acido arachidonico, è anormale la cartuccia contenente epinefrina, mentre l'ADP è normale. Sono anormali entrambi i test di un paziente che mostri patologie varie.

Ovviamente ci sono anche altre variabili che incidono sul risultato: farmaci, dieta. Quindi bisognerebbe avere l'attenzione di dire al paziente di evitare certi cibi e certi farmaci prima che venga eseguito questo test nel caso sia a scopo diagnostico di patologie piastriniche.
Questo test segnala la presenza di un difetto piastrinico, ma non definisce quale questo sia. Può essere alterato nella malattia di von Willebrand ma anche per deficit recettoriali piastrinici.
Questo rimanda ad uno step successivo per diagnosticare quale esso sia.

Questo test, rispetto al tempo di emorragia è comunque considerato più standardizzato, più affidabile nel risultato.

AGGREGAZIONE PIASTRINICA CON AGGREGOMETRO

Con metodi centrifugativi viene isolato il plasma ricco di piastrine a cui vengono aggiunti diversi agonisti. Quindi si osserva come le piastrine del soggetto rispondono aggregandosi. L'aggregazione viene letta, anche in questo caso, facendo passare luce nella provetta. Tuttavia, l'aggregazione delle piastrine determina un maggior passaggio di luce attraverso la provetta, ovvero aumenta la trasmittanza.

Curva di cambiamento ottico (*da slide, NdR*):

grazie alla curva di cambiamento ottico è possibile percepire come si muovono le piastrine.

- livello base

- aggiunta dell'agonista che determina una prima variazione della trasmittanza, in seguito allo shape change (che determina una riduzione della trasmittanza)

- successivo aumento della trasmittanza dovuto all'aggregazione

- degranulazione piastrinica e seconda onda di aggregazione
  (la seconda onda non è presente nel caso ci sia un deficit nella secrezione piastrinica, la curva rimane reversibile, invece che diventare irreversibile)

AGGREGOMETRIA CON STRUMENTAZIONE PIU' RECENTE

Le piastrine aderiscono a due elettrodi presenti nella strumentazione, e questo determina una riduzione della corrente passante fra i due elettrodi. In questo caso aumenta l'impedenza e non la trasmittanza e si determina quindi come avvenga l'aggregazione piastrinica. Ovviamente ci sono agonisti diversi, che agiscono su diverse vie dell'attivazione piastrinica; l'utilizzo differenziale di agonisti e l'eventuale osservazione di deficit a livello di differenti vie permettono di trarre conclusioni diversificate caso per caso.

Questo test è molto utilizzato per vedere l'efficacia della terapia antipiastrinica.

Il Clopidogrel (o Plavix, il suo nome commerciale) è un farmaco che blocca il recettore dell'ADP. Il farmaco che però viene assunto per via orale è inattivo, perché deve essere biotrasformato dal citocromo c epatico in forma attiva. Ci sono pazienti che hanno polimorfismi a livello dei geni dei citocromi, del CYP2C19 in particolare, che non biotrasformano il Clopidogrel in forma attiva. L'omozigote per alcuni polimorfismi del CYP2C19 non biotrasforma affatto il Clopidogrel a livello epatico, quindi è come se non fosse sottoposto a terapia. Come ci si può accorgere di questo? Eseguendo questo test è possibile notare che in realtà la risposta all'ADP non è inibita. Quindi conoscendo le vie di inibizione e attivazione dei vari farmaci antipiastrinici esistenti, è possibile comprendere se la risposta alla terapia è adeguata per la presenza di polimorfismi genetici (se il paziente assume o meno il farmaco e la conseguente risposta alla terapia è un altro discorso).

Il Verify Now è un altro strumento che viene sempre usato a questo scopo, ovvero per verificare rapidamente se il paziente è un responder o un non responder.

Questo è un altro meccanismo di studio delle piastrine che verifica una fosforilazione intrapiastrinica. I meccanismi di attivazione piastrinica portano a fosforilazione del VASP. L'inibizione da parte del Clopidogrel del recettore dell'ADP, in questo test, porta ad avere un'inibizione della fosforilazione. Quindi, in questo caso, il grado di fosforilazione del VASP determina se il paziente è un responder o un non responder. In questo caso, utilizziamo il test di funzionalità piastrinica per valutare se il farmaco è efficace o non efficace, non per la diagnosi.

La citometria a flusso serve anche per andare a valutare la presenza dei recettori. Questa tecnica usa degli anticorpi fluorescinati, che passando in un determinato canale vengono attivati da un raggio laser che vengono poi recepiti da una serie di fotomoltiplicatori. Con questa metodica sono identificabili sia antigeni, ovvero i recettori di membrana, sia delle forme di attivazione. Infatti, quando la piastrina si attiva, espone dei recettori che prima non erano presenti. Se le piastrine rilevate hanno PAT1 esposto significa che sono attivate, rappresentando un rischio protrombotico.

*Caso clinico (riassunto, NdR)*

*Test eseguiti:*
*- Test di funzionalità piastrinica: dati lievemente alterati.*

*- Test di aggregazione con ristocetina (antibiotico che attiva le piastrine): non c'è risposta.*

*- Test con sangue intero*
*- Test con plasma ricco di piastrine:*

*Il plasma ricco di piastrine è ottenuto con centrifugazione del sangue ad una velocità più bassa di quella usata normalmente, perché le piastrine che sono più piccole rimangono sospese nel plasma. Quindi deve essere aggiunto un agonista: ADP (1 mM), ristocetina, collagene, acido arachidonico, epinefrina.*
*Anche in questo caso non c'è risposta alla ristocetina, ma anche quella all'ADP e ad altri agonisti è bassa.*
*Test con citofluorimetro: gli anticorpi non riconoscono alcun CD42b sulla superficie piastrinica, perché questo recettore manca. Il CD42b è il recettore per i vWF (gp Ib α). Quindi la diagnosi è: sindrome di Bernard Soulier.*

<u>Valutazione pre operatoria</u>

Se il paziente non ha una storia personale o famigliare di sanguinamento, è possibile sottoporlo ad intervento chirurgico, soprattutto se di chirurgia minore, senza fare alcun esame preoperatorio. Nel caso sia un intervento di chirurgia maggiore è comunque consigliabile fare PT, aPTT e conta piastrinica.
Se invece il paziente ha una storia personale o famigliare di sanguinamento è consigliabile svolgere

qualche indagine in più, preferibilmente con anticipo rispetto all'intervento chirurgico o comunque anche se non deve essere sottoposto ad un intervento visto che ci sono già segni di eccessivo sanguinamento.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 4/4/2013 (1)

---

04.04.2013

Sbobinatore: Faccin Giulia

Revisore: Tot Emil

**Linee guida per l'impiego di marcatori tumorali**

Gian Luca Salvagno

In questa lezione tratteremo dei marcatori tumorali e il messaggio finale sarà che non sono né marcatori ne tumorali. Purtroppo c'è un problema di linguaggio, per cui ormai da molto tempo si fa uso in laboratorio di una nomenclatura spesso errata.

Un marcatore tumorale dovrebbe (è necessario usare il condizionale) essere ogni segnale biologico, misurabile nei liquidi corporei (tessuto ematico, urinario, liquido cefalorachidiano), correlato a presenza di neoplasia. Può trattarsi di un lipide, un saccaride o una proteina. I marcatori tumorali dovrebbero dare informazioni sulla diagnosi, lo stadio, la tipologia di neoplasia e lo stato della malattia.

In oncologia ci sono una serie di fattori che influenzano la presenza di questi marcatori:

-la loro produzione da parte del tumore

-il loro rilascio nel circolo ematico

-la loro produzione da parte di tessuti non neoplastici (accade molto spesso, se non quasi sempre)

-sostanze cross-reagenti: la cross reattività Ag-Ab causa l'incapacità di alcune sostanze di essere riconosciute da anticorpi monoclonali (vedi la questione degli apteni)

-diluizione di sostanze nel sangue, e loro metabolizzazione ed escrezione

(Slide) Questi sono solo alcuni dei marcatori, quelli più noti.

A sinistra vedete delle condizioni cliniche fisiologiche:

La gravidanza porta ad alterazione di una serie di biomarcatori come alfafetoproteina, gonadotropina corionica umana, CA125.

Il ciclo mestruale porta ad aumento dell'antigene CA125, erroneamente considerato un target del carcinoma ovarico; il medico deve dunque richiedere l'esame anche in funzione del ciclo mestruale.

L'attività sessuale stimola il rilascio di PSA, e ciò conferma l'importanza per il medico di conoscere il proprio paziente.

Il fumo di sigaretta porta ad aumento del CEA (Antigene Carcino-Embrionario), e della tireoglobulina.

L'alcool fa aumentare CEA e ferritina, oltre ad altri che sono minoritari.

L'attività sportiva intensa aumenta nei maschi il PSA; è stato fatto uno studio a tal proposito su ciclisti professionisti e si è notato l'aumento di PSA.

L'esplorazione rettale aumenta il PSA.

Ci sono poi condizioni patologiche:

Cirrosi epatica: nel veneto è una delle patologie più diffuse (è correlata con l'alcool) e dà un aumento di CEA, CIF21.1 (una citocheratina), TPA, TPS, CA19.9, CA50.

Epatite acuta: dà aumento di CA19.9, CA125.

Pancreatiti: aumentano CA19.9, CA50, CA125.

Patologie prostatiche benigne come ritenzione, prostatite, ipertrofia danno notevoli aumenti di PSA. Le prostatiti sono molto diffuse nella popolazione maschile di giovani di età media tra 30 e 50 anni.

Nella popolazione femminile carcinoma ovarico, endometriosi, flogosi peritoneale, pleuriti, polmoniti aumentano CA125.

Patologie tiroidee (ad esempio la tiroidite di Hashimoto) danno notevoli aumenti di tireoglobulina circolante, comunemente considerata un match mark di riferimento per il carcinoma midollare della tiroide.

L'infarto cerebrale dà aumento di NSE (Enolasi Neurone Specifica) in seguito alla lisi delle cellule cerebrali dovuta alla sofferenza per ipossia. L'NSE, usato dai rianimatori come indice prognostico di sofferenza cerebrale, veniva comunemente usato per il microcitoma polmonare. Il campione emolitico invece dà rilascio di enolasi eritrocitaria, che tuttavia non siamo in grado di discernere dalla NSE.

Danni del sistema nervoso centrale aumentano S100.

Le domande che ci poniamo (e che verranno poste all'esame) riguardo i marcatori tumorali in biochimica riguardano la loro utilità in screening, diagnosi, stadi azione, terapia, follow up.

**Screening**

Un programma di screening è un programma di salute pubblica in una popolazione (che può essere generale oppure bersaglio) in cui ci sia una prevalenza di una patologia conosciuta.

Per effettuare un programma di screening serve un indice diagnostico con ridotti falsi negativi e dunque con alta sensibilità (piuttosto che con ridotti falsi positivi), poiché l'obbiettivo è di non mancare l'individuazione di pazienti affetti. Devono inoltre sussistere uno strumento terapeutico e una compliance da parte del paziente ad accettare lo screening (che si effettua perciò gratuitamente).

Attualmente non sono molti i programmi di screening attuati:

-Screening colorettale (carcinoma colon-retto): si basa sul prelievo di un campione di feci per rilevare sangue occulto fecale. Il test immunochimico consente di valutare, tramite una reazione Ag-Ab, tracce di sangue nelle feci rilevando l'emoglobina o l'albumina. Viene usato in programmi a vasta scala: i pazienti sono invitati a consegnare gratuitamente i campioni in centri di raccolta; i pazienti risultati positivi (tra cui molti falsi positivi vista la bassa specificità del test) saranno sottoposti a colonscopia.

-Mammografia (carcinoma alla mammella)

-Test di Papanicolau o Pap test (carcinoma della cervice uterina)

Se manca il presupposto clinico l'esame di laboratorio è generalmente inutile; ci sono pochissimi esami di laboratorio utili a prescindere dal presupposto clinico, tra cui la glicemia misurata dopo i 40 anni vista la grande diffusione del diabete. Ci sono poi dei programmi regionali (ad esempio "la tiroide scende in piazza") che tuttavia sono fonte di dibattito scientifico.

Dunque i marcatori biotumorali non sono assolutamente utili per lo screening: ciò è dovuto alla presenza di troppi falsi negativi per carcinomi non rilevabili biochimicamente e anche di troppi falsi positivi.

Due anni fa sul New England Journal of Medicine è stata negata l'utilità dell'ultimo biomarcatore usato per lo screening, ossia il PSA (Antigene Prostatico Specifico), che veniva misurato ai maschi oltre i 50 anni. Su PubMed 2010-2011è pubblicato l'articolo, che definisce tale screening non utilizzabile a seguito di un eccesso di inutili biopsie prostatiche e prostectomie (il 40% delle quali causa impotenza) e dunque di cause di pazienti contro i medici.

**Diagnosi**

Nessun marcatore biochimico è utile per l'eccesso di falsi positivi e negativi.

La diagnosi di neoplasia si basa quasi sempre sull'Anatomia Patologica, ossia sull'analisi istochimica eseguita sul pezzo operatorio. Anche la diagnostica per immagini è molto utilizzata, ma non dà certezza; l'unica certezza può provenire dall'anatomo patologo e dunque dalla biopsia eseguita dal chirurgo prima di intervenire.

**Bilancio in stadiazione**

Ci sono alcune classificazioni neoplastiche in cui il biomarcatore è associabile a diversi gradi di stadiazione, dunque talvolta i marcatori sono utili.

**Dopo la terapia primaria** (in genere farmacologica) e nel **Follow up**

In queste fasi i biomarcatori sono molto importanti.

Un esempio è dopo la prostectomia: il timore è che la neoplasia possa aver superato la lamina basale formando metastasi in altre sedi. L'urologo richiede la valutazione del PSA ciclicamente ogni 6 mesi-1anno per accertarsi che non sia dosabile. Se il PSA aumenta c'è del tessuto neoplastico secernente rimasto.

Il follow up riguarda anche il CA19.9 (carcinoma colon-retto), CA15.3 (carcinoma mammella), CA125 (carcinoma ovarico), CEA (epatocarcinoma o colangiocarcinoma).

Un'indagine sulla preparazione dei medici riguardo la finalità più importante dei marcatori ha rivelato che circa ¼ ritiene siano utili alla diagnosi, ¼ allo screening, il 2% non sa dare una risposta, il 25% sostiene servano allo screening e il 41% al monitoraggio. Questa carenza di preparazione dei medici comporta non solo aumento dei costi per inutili indagini, ma anche danno al paziente.

In reparto i marcatori CA vengono in genere richiesti assieme, così come AST e ALT (indici di funzionalità epatica); sono chiamati "i fidanzati del laboratorio". Queste sono delle abitudini dei medici.

Ci sono tuttavia molti carcinomi non secernenti e ciò dipende dal grado di differenziazione tumorale: se il carcinoma è molto aggressivo e poco differenziato può non produrre queste molecole. Non ci sono marcatori strettamente neoplastico-specifici; sono delle sostanze normalmente presenti nei liquidi biologici (ad esempio il PSA è normalmente rilevabile nel tessuto ematico dei maschi).

Il ministero della salute fa ciclicamente delle indagini conoscitive (sui medici). Questa è fatta a Verona e riguarda l'associazione dei marcatori all'organo bersaglio di indagine. Solo il 2% non associa PSA alla prostata (dunque il 98% lo conosce), mentre solo il 50% correla il CA125 all'ovaio; l'associazione del colon al CA19.9 e della mammella al CA15.3 sono già più conosciuti.

In rete sono pubblicate le linee guida del National Academy of Clinical Biochemistry: vengono presi in considerazione i tumori con maggiore prevalenza (ovaio, polmone, mammella, prostata) e valutati tutti i marcatori associati.

A Verona si studiano in particolare i marcatori associati al carcinoma ovarico. Nel 2003-2004 è emerso HE4, una proteina dell'epitelio ovarico che è aumentata nel carcinoma ovarico. HE4 non ha soppiantato CA125, ma bensì questi due marker sono stati uniti in un algoritmo chiamato ROMA (acronimo per: rotazione del rischio per pazienti con carcinoma ovarico) cercando di ottenere un indice diagnostico. Spesso il carcinoma ovarico (e molte neoplasie) sono silenti e l'esame prescelto è in genere l'ecografia trans vaginale o l'ecoaddome per prelevare la massa e verificarne la natura. Si cerca di ottenere un esame diagnostico ematochimico per aumentare la compliance delle pazienti (semplicità della raccolta).

Con l'indice ROMA la predittività ha raggiunto l'80-85%.

Dunque ricapitolando per quanto riguarda la finalità dei marcatori, in diagnosi ci sono alcuni marcatori istotipo-specifici, ma conosco l'istotipo solo al termine del processo diagnostico per cui i marcatori non sono utili, in bilancio e stadiazione ci sono dubbi mentre dopo il primo trattamento e in follow up i marcatori assumono un ruolo importante per verificare efficacia e recidiva.

Quali sono le caratteristiche ideali di un marcatore?

1. Neoplastico specifico: prodotto esclusivamente da quella neoplasia
2. Precoce: prodotto dalla neoplasia ancora confinata nella lamina basale
3. Correlato allo stadio di malattia
4. Utile per seguire il follow up terapeutico

Quelli noti hanno solo alcune di queste caratteristiche.

I biomarcatori più usati in oncologia sono i seguenti:

Famiglia dei CA (Cancer Antigen)

Sono molto numerosi, ma i più usati sono tre; non sono organo-specifici ma hanno una prevalenza d'organo e sono contenuti nel lume dei dotti tubulari.

CA125 (carcinoma ovarico)

CA15.3 (carcinoma mammella)

CA19.9 (carcinoma colon-retto, colangiocarcinoma, carcinoma pancreatico)

-CA19.9: è una mucina (carboidrato) sintetizzata normalmente dalle cellule epiteliali di pancreas, dotti biliari, stomaco, colon, endometrio e cellule salivari. Può essere aumentato in pazienti con danni epatici, pancreatici o delle vie biliari. Per la diagnosi e la terapia di patologie biliari, del pancreas e della papilla del Vater si fa ERCP (colangiopancreatografia retrograda perendoscopica): endoscopio attraverso la bocca giunge al duodeno per iniettare una sostanza opaca ai raggi X per la visualizzazione radiologica dei dotti biliari e/o del pancreas. Si può così anche prelevare tessuto biliare o pancreatico.

-CA125: è una mucina sulla sierosa che ricopre l'ovaio; dopo l'ovulazione passa dal liquido peritoneale al sangue.

CEA (Antigene Carcinoma Embrionario)

E' principalmente associato a carcinomi o patologie del tratto GI ed epatico.

Cromogranina

Proteina della famiglia delle granine usata principalmente per le patologie neuroendocrine (ghiandolari).

La cromogranina aumenta molto selettivamente in pazienti che assumono inibitori di pompa (come l'omeprazolo); serve un wash-out di almeno 3-4 giorni per poterla usare come indicatore nel follow up.

PSA (Antigene Prostatico Specifico)

Glicoproteina prodotta dalla prostata e secreta nel liquido seminale; una quota può essere presente in circolo. Si pensava che un aumento di PSA fosse correlato a patologia prostatica, tuttavia molti studi clinici hanno dimostrato una elevata non-specificità per l'adenocarcinoma della prostata. L'uso come marcatore tumorale ha portato a molte inutili prostectomie.

PSA circolante è legato a diverse proteine quali l'albumina e SHBG (sex hormone binding globulin) oppure libero; è possibile determinare la quota di PSA libero nel sangue (freePSA).

Il freePSA è un esame richiesto specificamente dal medico.

Si è creato un algoritmo che unisse PSA totale e PSA libero (in un rapporto):

PSA libero / PSA totale : >15% diminuito rischio

<15% aumentato rischio

Lo scopo dell'algoritmo è di aumentare la predittività del PSA per ridurre le biopsie prostatiche. Nel caso della prostata infatti la biopsia è molto complessa oltre che per la sede dell'organo, per il numero di campionamenti richiesti dall'anatomo patologo (15/20). Spesso nonostante i numerosi campionamenti non si individuano le cellule tumorali: aumentando il numero di prelievi aumento la probabilità di individuare un eventuale adenocarcinoma.

Dal 2011 si usa un algoritmo chiamato PHI-test, in cui è stato aggiunto un ulteriore esame ossia il proPSA.

A livello biochimico infatti il PSA è presente anche come precursore che poi viene clivato; c'è del proPSA circolante. Si sono sviluppati anticorpi monoclonali specifici per il proPSA.

Dunque il PHI-test considera tre biomarcatori collegati insieme in un algoritmo: PSA totale, PSA libero, proPSA. Ora si vuole verificare se può essere utile dal punto di vista diagnostico per ridurre le biopsie e aumentare il livello predittivo del test per raggiungere almeno il 90%.

C'è tuttavia una precisazione: il PSA libero ha valore solo se il PSA totale è compreso tra 2,5 e 15 nanogrammi, altrimenti perde significato in quanto l'algoritmo non è applicabile.

CYFRA 21.1

E' una citocheratina che ha qualche utilità in alcune patologie polmonari (adenocarcinoma). Ha un uso molto limitato perché dà molti falsi positivi.

Tireoglobulina

Proteina residenziale all'interno dell'acino della cellula tiroidea; è un biomarcatore molto usato per la sua specificità per il carcinoma midollare della tiroide. Viene usato solo nel follow up perché viene secreto anche in caso di infiammazione della tiroide.

La patologia tiroidea è molto diffusa, interessa principalmente femmine ed è spesso silente; la sintomatologia è soffusa e include astenia, stanchezza, difficoltà di concentrazione. La diagnosi è di tipo clinico-laboratoristica.

TSH

Ormone ipofisario (asse ipotalamo ipofisarioTRH TSH tiroide). L'esame viene chiesto da solo perché in questo caso il feedback è estremamente preciso. In laboratorio si sono costruiti degli intervalli di riferimento che hanno valenza aggiuntiva in quanto riescono a valutare anche situazioni di ipo- o iper- tiroidismo. L'intervallo considerato è tuttavia metodo-specifico e gli intervalli non sono perfettamente sovrapponibili, specialmente nel loro limite superiore. Ci sono dei metodi di terza generazione per valutare concentrazioni più basse di TSH usando come unità di misura le milli-unità internazionale su litro (manca un calibratore internazionale di massa). TSH ha un intervallo di circa 0,3/3-4.

Se il TSH è esterno all'intervallo si utilizza il TSH-REFLEX. Si tratta di un algoritmo e il medico dà l'autorizzazione a proseguire nel percorso diagnostico: in laboratorio si valutano subito gli ormoni tiroidei, fra cui il più importante è il T4.

In caso di ipotiroidismo (TSH>3) la tiroide è scarsamente funzionante (basso T4, talvolta indosabile); il TSH può raggiungere livelli di 150!). Essendo una patologia silente il paziente si

presenta dopo mesi lamentando stanchezza. Spesso l'ipotiroidismo è causato da patologie infiammatorie; tipica è la Tiroidite di Hashimoto (medico giapponese che per primo la descrisse), caratterizzata da iniziale ipertiroidismo dovuto alla distruzione della tiroide e al rilascio massiccio di ormoni tiroidei (ipertermia, agitazione), seguito da ipotiroidismo (diminuzione anche delle capacità cognitive). In questo caso si ricercano Ab specifici per tireoglobulina e tireoperossidasi, rilasciate quando c'è distruzione dell'acino.

Quando c'è carcinoma midollare della tiroide c'è secrezione di tireoglobulina; c'è in ogni caso una quota circolante.

Se ci sono Ab anti-tireoglobulina questo ostacola analiticamente la capacità di determinare la tireoglobulina: la valutazione è sottostimata. Dunque la tireoglobulina andrebbe riservata al follow up: viene usata ad esempio in medicina nucleare per monitorare la progressione della cura del paziente.

Ferritina

E' un biomarcatore non oncologico ed è l'esame centrale per la diagnosi di anemia sideropenia. Al di sotto di 12-15 microgrammi le scorte di ferritina sono esaurite.

La ferritina tuttavia è anche una proteina flogistica della fase acuta, dunque è elevata in caso di infiammazione acuta.

Studiata come marcatore nell'emocromatosi, una patologia da accumulo di ferro per deficit genetico di enzimi. Normalmente l'intervallo di ferritina è compreso tra 150 e 200 microgrammi, mentre in questi pazienti il livello può raggiungere i 2000. Le complicanze sono cardiomiopatie ed epatopatie e la terapia è ferro-chelante.

In caso di emocromatosi vanno richiesti anche sideremia (quantità di ferro circolante) e transferrinemia (determinazione in grammi su decilitro della transferrina): è importante il rapporto tra i due che prende il nome di saturazione della transferrina che è normalmente tra 30 e 60%. Se la saturazione della transferrina è maggiore del 60% è un indice di aumentata probabilità di sovraccarico di ferro.

La ferritina è importante nella medicina dello sport: molti sportivi hanno sovraccarico marziale (di ferro) perché lo assumono impropriamente.

La ferritina è usata anche in patologie ematologiche: è un biomarcatore in oncologia in maniera indiretta.

Alfafetoproteina

Nella diagnosi prenatale viene dosata nel liquido amniotico: indice di aumentato rischio di trisomia 21.

Su tessuto ematico viene dosata per l'epatocarcinoma (prodotta dal fegato).

In gravidanza è aumentata.

Gonadotropina Corionica Umana

Alfa-beta globulina (ha catene alfa e beta) rilasciata dal sincizio trofoblasto. Si associava direttamente alla gravidanza: tuttavia la sua assenza è associata al 99% a non-gravidanza ma non al 100% poiché viene prodotta dopo 6-7 giorni dalla fecondazione, quando avviene l'impianto uterino.

Oggi si rilevano fino a 0,1 microunità su litro.

La diagnosi di gravidanza è clinica: il ginecologo deve identificare la camera.

Dei frammenti di HCG sono filtrati nei reni e sono rilevabili nelle urine (test di gravidanza). Tuttavia la sensibilità nelle urine è di 20 milliunità (bassa) e l'esame nelle urine non si usa in laboratorio. In laboratorio si usa solo siero o plasma.

HCG viene prodotta nel maschio in caso di seminoma e neoplasie del testicolo.

In laboratorio si richiede la determinazione non tanto di HCG completa ma delle catene beta libere (free-betaHCG) . L'interesse è di urologi, pediatri e ginecologi (mola idatiforme).

Si parla di betaHCG perché le catene alfa di HCG sono simili alle catene alfa di FSH-LH e i primi test davano molti falsi positivi. Si sono dunque sviluppati Ab specifici per la catena beta di HCG.

Oggi si usano due Ab monoclonali per riconoscere HCG sia integro (naive) che troncato (per proteolisi).

Oggi HCG viene anche usato raramente per il monitoraggio oncologico.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 11/4/2013 (1)

---

## MEDICINA DI LABORATORIO

Sbobinatore: Leonardo Lorenzetti

Revisore: Zanetti Elisa

*Questa lezione si propone di completare la prima parte dell'emogasanalisi affrontata durante le lezioni a piccoli gruppi del Venerdì. Dal momento che sono per lo più casi clinici, per una miglior comprensione si consiglia di studiare prima la parte teorica.*

------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

*N.dR. ho pensato dunque di aggiungere qui schematicamente quanto fatto all'esercitazione.*

### EMOGASANALISI

Obbiettivi clinici

- Controllo dell'equilibrio acido - base del paziente
- Controllo dello stato di ossigenazione del paziente
- Importanza dello studio degli elettroliti plasmatici strettamente connessi con la regolazione dell'equilibrio acido-base.

Parametri dell'emogasanalisi

- pH = -log $[H^+]$
- - log $[H^+]$ = log negativo dell'attività ioni $H^+$
- 7,4 = 40 nmol/L $[H^+]$
- i 1 unità di pH rappresenta un h di 10 volte nell'attività di ioni $H^+$

Equazione di Henderson-Hasselbach **pH=pK+log [HCO3-]mmol/L / [Pco2]mmHgx0,03** = 20:1

$CO_{2d}$ = **a x** $pCO_2$ =(0.0306 x 40 mmHg) = 1,2 mmol/L

Dove **a =** coefficiente di solubilità di $CO_2$ nel sangue a 37° pari a 0.03 mmol /L/ mm Hg .

Quindi risulta **pH** = 6,1 + log (24 mmol/L/1,2 mmol/L)

= 6.1 + log 20 = 6.1+1.3 = **7.4**

pH normale 7.35-7.45 36-44 nmol/L $H^+$

Produzione endogena di ioni $H^+$ tende a **i** il pH ; per opporsi a questa ¯ l'organismo ricorre a

1) eliminazione di acidi volatili ($CO_2$) via ventilazione polmonare ® 15.000-20.000 mmol/24 h

2) eliminazione per via renale di acidi fissi non volatili (acido lattico, chetoacidi, ossidazione aminoacidi contenenti $SO_4$, $PO_4$**)** **®** 50-100 mmol/24 h

3) importanti anche i tamponi fisiologici : $HCO_3^-$ (pK 6.1), proteinati ($HProt^-$), HHb e fosfati (pK 6.8)

**$pCO_2$** [mm Hg o kPa (unità SI) ] misurata direttamente con elettrodo

- pressione parziale della $CO_{2d}$ nel sangue**,** funzione della quantità di $CO_2$ disciolta fisicamente ($CO_2$d)
- È la componente respiratoria dell'equilibrio acido base (acido volatile)

$pCO_2$ nel sangue arterioso è 40 mm Hg oppure 5.3 kPa, ma variabile fra 35 e 45mmHg.

Ricordo che 1kPa = 7.5mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa .

**$CO_2$ totale**

- Include i bicarbonati e la $CO_2$ disciolta ($dCO_2$)
- $CO_2$ totale = $HCO_3^-$ + ($pCO_2$ x 0.03)
- $dCO_2$ = $CO_2$ disciolta fisicamente + $H_2CO_3$
- $CO_2$+$H_2O$ « $H_2CO_3$ « $H^+$ + $HCO_3^-$
- Nel plasma manca anidrasi carbonica (catalizza idratazione ad $H_2CO_3$.)
- Per questo motivo, nel plasma l'equilibrio della reazione è tutto spostato a favore della $CO_2$**d** (700:1).
- $CO_2$ + $H_2O$ « $H_2CO_3$ (trascur. nel plasma)

Bicarbonati ($HCO_3^-$)

calcolati in base all'equazione di Henderson-Hasselbach o con l'uso di nomogrammi, una volta noti il pH e la $pCO_2$ .

- tampone più concentrato
- componente metabolica dell'equilibrio acido-base
- anioni più rappresentati dopo i cloruri
- pK 6,1; plasma pH 7,4.
- Costituiscono un sistema aperto !!!

Basi tampone nel plasma e nel sangue

$HCO_3^-$ (24) + Proteinati$^-$ (16) = 40 mmol/L (BB plasma)

$HCO_3^-$ + Proteinati$^-$+ $Hb^-$ = 46 mmol/L (BB sangue intero)

**<u>BE (Eccesso Base)</u>**

- mmol/L di acido o base necessari per portare a pH 7.4 un campione di sangue ossigenato equilibrato a una $pCO_2$ di 40 mmHg a 37°C.
- scostamento in eccesso o in difetto dalla normale BB (normale: -2/+2). Se alterato, indica sempre <u>un'alterazione metabolica</u> <u>primitiva o compensatoria.</u>

Equilibrio Acido-Base (37°)

| | prelievo arterioso | prelievo venoso |
|---|---|---|
| pH | 7.35-7.45 | 7.32-7.38 |
| $pCO_2$ (mm Hg) | 40(1.22) | 45 (↑2-8) |
| $pO_2$ (mm Hg) | 80-100 !! | [ 30-40mm ] |
| $HCO_3^-$ (mmol/L) | 24 | 27 |
| $CO_2$ tot.(mmol/L) | 25.2 (25.2 mmol/L) | 28.35 |
| BE | +2/-2 | +2/-2 |
| Sat%$O_2$ | > 95% | |

**OSSIMETRIA**

| | |
|---|---|
| Ht | 36-47 % |
| Hb | 12-16 g/dL |
| $FHbO_2$ | 94-97% |
| FHHb | 0.0- 5% |
| FCOHb | 0-1.5% |
| FMet Hb | 0-1.5% |
| SulfHb | |

$SO_2$ % : saturazione di O2 del sangue.

Valori di riferimento: > 95%

% dell'emoglobina funzionale saturata con l'ossigeno. Costituisce una misura indiretta per valutare la $pO_2$

concentrazione ossiemoglobina (g/dL) / concentrazione emoglobina tot. funzionale

dove emoglobina totale funzionale corrisponde alla somma $cHbO_2 + cHHb$

Per determinare $HbO_2$ e HHb vengono usati metodi spettrofotometrici, che sono alla base della semplice ossimetria. [assorbimento di luce 660 nm ($HbO_2$), ) 940nm (HHB)]

**Ossiemoglobina frazionale ($FHbO_2$)**

$FHbO_2 = cHbO_2/ctHb$

ctHb = concentrazione Hb totale (somma di $HbO_2$, HHb, COHb, MetHb e SulfHb)

Questa espressione richiede la misura di tutte queste forme, valutate con gli apparecchi dell'emogasanalisi.

iii di $FHbO_2$ : avvelenamenti, che convertono l'emoglobina in COHb, MetHb e SulfHb, cian-meta-Hb, forme incapaci di trasportare ossigeno.

Determinazione spetrofotometrica sull' emolisato di sangue ( lettura tra 335-670nm)

**Prelievo per emogasanalisi (1)**

- Sangue arterioso: campione ottimale in quanto riflette gli scambi a livello polmonare
- stretta anaerobiosi ($pO_2$ nell'aria circa 150 mmHg e $pCO_2$ 0,25 mmHg, per cui se il sangue si mescola con bolle d'aria, $pO_2$ ↑ e $pCO_2$ ↓). Siringa a tenuta d'aria tappata subito per evitare gli scambi con aria
- anticoagulante eparina liofilizzata (o litio-eparina in quantità appropriata; se troppa, induce variazioni **p**$CO_2$ **e** pH e errori diluizionali)
- campione processato al più presto (max 30 min) e la t° mantenuta a 2-4°C, per breve tempo per arrestare il metabolismo cellulare fino al momento dell'analisi.
- coaguli nel campione

Gap anionico

Parametro utile nella diagnostica differenziale delle acidosi metaboliche e dei disturbi misti

$[Na^+ + K^+] - [Cl^- + HCO_3^-] =$ 12-15 mmol/L

Questa formula non include proteinati, acidi organici, fosfati e solfati.

GAP 2/3 proteine

1/3 anioni organici (acido lattico, acetacetico , b-OH butirrico, $PO_4^{--}$, $SO_4^{--}$ ).

-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

-------------------------------------

## EMOGASANALISI: PARTE CLINICA

*Questa lezione si propone di completare la prima parte dell'emogasanalisi affrontata durante le lezioni a piccoli gruppi del Venerdì. Dal momento che sono per lo più casi clinici, per una miglior comprensione si consiglia di studiare prima la parte teorica.*

**Fondamenti dell'equilibrio acido-base:**

L'equilibrio acido-base si basa essenzialmente su un rapporto tra i bicarbonati (componente metabolica dell'equilibrio) e la PCO2, espressa in mmHg oppure in mmol/L (componente acida volatile che viene eliminata tramite la via respiratoria). Infatti secondo l'equazione di Henderson Hasselbach: **pH=pK+log** = 7.4 *(Per ulteriori spiegazioni consultare la lezione teorica.)*

Il **BE** è lo scostamento in difetto o in eccesso dalla normale buffer base, dalla base tampone che è data dalla somma di bicarbonati, proteinati ed emoglobina (perché anche l'Hb ha un ruolo tamponante nei confronti degli ioni $H^+$. Per definizione 1g di Hb trasporta 0.42 mmol di ioni $H^+$). *(N.d.R Buffer Base plasma= $HCO3^-$ (24)+ Proteinati (16)= 40mmol/L BB sangue intero= $HCO3^-$+ Proteinati+ Hb=46mmol/L).*

**Se l'eccesso base (BE) è alterato indica sempre un'alterazione metabolica primitiva o compensatoria.**

Oggi il BE viene calcolato anche così; Supponiamo di avere un paziente con:

- pH=7.28 (acido)
- $HCO3^-$ = 14 mmol/L (bassi perché il Valore Normale è di **24**)
- $PCO_2$= 38mm  (Valore Normale **35-45**)

Abbiamo a che fare con un'**acidosi metabolica senza compenso,** dove cioè la PCO2 è normale. Il suo BE si può calcolare senza tener conto dei proteinati e dell'Hb e guardando solo lo scarto tra il valore reale dei bicarbonati (14) e il valore normale (24). In questo caso il BE risulterà di -10.

La saturazione, che oggi si misura con degli apparecchietti contenenti un piccolo spettrofotometro, è  Saturazione È la concentrazione dell' ossiemoglobina, cioè dell'emoglobina ossigenata in grammi decilitro, fratto la concentrazione emoglobinica totale funzionale.

L'emoglobina trasportata dall'anello porfirinico è saturata a circa il 90% e, in condizioni di massima saturazione, può arrivare al 95%. L'ossigeno trasportato liquidamente ha un coefficiente di solubilità molto basso per questo dev'essere trasportato dall'Hb, legandosi reversibilmente in corrispondenza degli anelli dell'eme. Il legame dev'essere reversibile cosicché l'$O_2$, giunto ai tessuti, può essere rilasciato.

L'emogasanalisi è un apparecchio che ci da informazioni riguardanti:

| | arterioso | venoso |
|---|---|---|
| pH | 7.35-7.45 | 7.32-7.38 |
| $PCO_2$ (mmHg) | 40 | 45 |
| $PO_2$ (mmHg) | 80-100 (in eq. con l'aria) | 30-40 |
| $HCO3^-$ (mmol/L) | 24 | 27 |
| $CO_2$ tot. (mol/L) | 25.2 | 28.35 |

La grande differenza tra prelievo arterioso e venoso è soprattutto a livello della $PO_2$. Nel sangue venoso è molto più bassa perché l'$O_2$ viene ceduto ai tessuti. Nel venoso vi è anche un minimo aumento dei bicarbonati.

Un prelievo per l'emogasanalisi dev'essere:

- **Sangue arterioso**: è il campione ottimale perché riflette gli scambi a livello polmonare. Bisogna fare molta attenzione a non mescolare il venoso con l'arterioso!
- **Stretta anaerobiosi**. Infatti la $PO_2$ nell'aria è di circa 150mmHg mentre la $PCO_2$ di 0.25mmHg. Perciò se il sangue viene a contatto con bolle d'aria avremo ↑$PO_2$ e ↓$PCO_2$. Per

questo motivo si usa una siringa a tenuta d'aria che viene tappata subito per evitare gli scambi.

- **Anticoagulante eparina liofilizzata** (o litio-eparina) in quantità appropriata se troppa infatti induce variazioni di $PCO_2$ e pH
- **Tempo.** Non si deve aspettare più di 30minuti e dev'essere mantenuta a 2-4°C per bloccare il metabolismo cellulare.

Se il **pH>7.45** si tratta di ALCALOSI, se invece **pH<7.35** si parla di ACIDOSI.

L'**alcalosi** può essere:

- **Metabolica:** con **$HCO3^-$ elevati** e **BE↑**. Con lo scorrere dei giorni, l'organismo tende a creare un suo compenso respiratorio, ossia cerca di trattenere la $PCO_2$ respiratoria(che è un acido volatile dal momento che può idratarsi e creare $H_2CO_3^-$).*(N.d.R Diminuendo il numero di atti respiratori).* Anche il BE aumenta per l'accumulo dei bicarbonati.
- **Respiratoria:** con **$PCO_2$ bassa** e **BE invariata**. L'individuo iperventila e quindi elimina $PCO_2$ innalzando il pH. Il compenso metabolico è renale e consiste in un'aumentata escrezione di $HCO_3^-$ e una conseguente diminuzione della BE.

L'**acidosi** può essere:

- **Metabolica:** è la più frequente di tutte. Presenta un **calo di $HCO_3^-$** (dato da diverse condizioni cliniche quali diabete, ipossia, scompenso…etc) e un relativo **BE↓**. Il compenso respiratorio può essere fatto attraverso una iperventilazione, ossia si elimina maggiormente la $PCO_2$ volatile. Anche il BE rimane diminuito.
- **Respiratoria:** l'individuo è incapace di respirare, perciò la **$PCO_2$ aumenta** tantissimo perché non può essere eliminata per via respiratoria. I bicarbonati sono normali tanto che il **BE** rimane **invariato**. La $PCO_2$, oltre una certa soglia, paralizza i centri respiratori perciò bisogna intervenire tempestivamente mettendo un casco o delle mascherine che permettono l'espirazione della $CO_2$. Il compenso metabolico renale è l'aumentato riassorbimento dei bicarbonati e quindi ↑BE.

**Casi clinici**

**-**

**1)** Una donna di 25 anni entra in P.S con grave dispnea e agitazione. Presenta:

| pH | **7.15** |
|---|---|
| $PCO_2$ | **18** |
| $HCO_3^-$ | **8** |

I ridotti valori di $PCO_2$ sono in accordo con la difficoltà respiratoria. L'acidosi in questo caso è data dai ridottissimi valori di bicarbonato. Si sospetta perciò un' **acidosi metabolica.** Il compenso respiratorio molto evidente non riesce comunque a riportare alla normalità il pH.

Di fronte ad un'acidosi si controlla sempre il **Gap Anionico**, ossia la differenza tra il valore della somma dei cationi ($Na^+$ e $K^+$) e il bicarbonato più il cloro. Nel nostro paziente:

$$\mathbf{[Na^+ + K^+]-[HCO_3^- + Cl^-]}$$

$$=$$

$$[128+4]-[94+8]$$

$$=$$

**30 mmol/L**

I valori normali devono essere intorno a **14 mmol/L**.

Perciò questa è un'acidosi metabolica che ha creato molti metaboliti acidi che possono essere chetoacidi, acido lattico, altre sostanze tossiche.

*(N.d.R Qui comincia una digressione sull'osmolarità, ossia il numero di molecole per litro di soluzione. Cita anche l'osmolalita, più esatta, che è il numero di particelle per Kg di solvente. Si vuole dimostrare cosa succede in casi come questo, con glicemia di 420 g/dL che in osmolalità diventa di 233 (4200 g/L / 18 peso molecolare del glucosio). Se c'è un'osmolalità maggiore nel plasma l'acqua viene richiamata dal LEC , la sodiemia misurata è più bassa e l'osmolalità è diminuita. In pratica tutte le iposodiemie da diabete sono basse perché c'è un passaggio di acqua dal LEC al LIC, richiamato dalle molecole osmoticamente attive diverse dal sodio. Altri soluti passano indifferentemente all'ECF e all'ICF e non contribuiscono all'osmolalità.)*

Il **Gap anionico aumentato** può essere dato da:

- Diabete I, digiuno prolungato, alcolismo che danno tutti una **chetoacidosi.** I chetoacidi sono acido acetacetico, acido β-idrossibutirrico e l'acetone (che deriva dall'acetacetico decarbossilato).
- Shock, ipossia, insufficienza epatica, convulsioni prolungate, stasi intestinale, Fenformina e Nitroprussiato che producono **acidosi lattica.**
- Insufficienza renale grave.
- **Acidosi da sostanze tossiche.**

Il **Gap Anionico normale** è dato da ritenzione di ioni $H^+$ per via renale oppure perdita di $HCO_3^-$ per via intestinale (*N.d.R ma con aumento di* $Cl^-$). Esempi di patologie correlate sono: insufficienza renale iniziale, acidosi del tubulo renale, drenaggio enterico, diarrea, inibitori di anidrasi carbonica, fistole biliari o pancreatiche, farmaci.

**2)** Un uomo di 67 anni viene ricoverato per dispnea e senso di oppressione retrosternale. Alla radiografia toracica c'è un ingrandimento dell'ombra cardiaca e chiazze di addensamento alle basi polmonari, bilateralmente. Presenta:

| pH | 7.30 | |
|---|---|---|
| $PCO_2$ | 36 | Valore Normale 35-45 |
| $HCO_3^-$ | 14 | |
| $PO_2$ | 55 | VN >60-65 |
| glucosio | normale | |
| Lattato | 14 | 2 |

Con una $PO_2$<60 il paziente fatica a respirare. Usando altri dati raccolti, si calcola il Gap Anionico che risulta 27 mEq/L. Si tratta quindi di un' **acidosi metabolica** causata da **insufficienza cardiaca** (suggerita anche dal senso di oppressione retrosternale ma soprattutto dall'ingrandimento dell'ombra cardiaca e dalle chiazze di addensamento). Il cuore non pompa bene e si generano situazioni di anaerobiosi dovute all'ipossia. Normalmente il glucosio si tramuta in piruvato il quale, in aerobiosi, entra nel ciclo di Krebs mentre se manca ossigeno viene ridotto a lattato e quindi crea acidosi. Perciò in condizioni di scompenso cardiaco c'è sempre aumento di acido lattico.

**3)** Un uomo di 47 anni viene trasferito in P.S in stato di coma dopo aver trafficato con l'auto in garage. Viene misurata la pressione che risulta bassissima (80/40 mmHg). Viene subito intubato.

| pH | 7.1 | |
|---|---|---|
| $PCO_2$ | 30 | |
| $HCO_3^-$ | 14 | |
| $PO_2$ | 182 | Alta perché è intubato!! |
| Azotemia | 60 | Alta |
| Creatinina | 3.3 | Alta (filtrato glomerulare molto ridotto) |
| sodio | 145 | |
| potassio | 4 | |
| bicarbonati | 14 | |
| cloro | 108 | |
| glucosio | 99 | |

Il Gap Anionico risulta di 27 mEq/L. Si tratta chiaramente di **acidosi metabolica**, anche se le motivazioni rimangono poco chiare. Viene così sottoposto ad un sedimento urinario da cui si vedono ossalati *(N.d.R i rombi più grandi e marroni)* e calcoli di Etilenglicol (*N.d.R quelli più piccoli, tondi e gialli).* Quest'ultimo è un antigelo e l'uomo vi è venuto in contatto trafficando con la macchina.

L'osmolalita in genere può aumentare tramite l'aumento della concentrazione ionica (per lo più del sodio), o per l'aumento di sostanze non ioniche già presenti nel plasma (come il glucosio) oppure tramite l'aggiunta di sostanze esogene a basso peso molecolare (alcoli, glicoli oppure farmaci), come avviene in questo caso. La differenza tra l'osmolalità misurata con l'osmometro e quella calcolata con la formula ( $2[Na] + \frac{\text{glicemia}}{\text{18 (peso molecolare del glucosio)}} + \frac{\text{Azotemia}}{\text{60 (il suo peso molecolare)}}$ il cui valore normale è di solito 2.80%) di solito è intorno a 10. Se la differenza aumenta è possibile un accumulo di sostanze esogene. Nel nostro caso il gap è di 18. Il paziente aveva acidosi metabolica a gap alto con compromissione renale grave, derivata da una sostanza tossica che ha alterato l'osmolalità e la funzione renale.

**4)** Una ragazza di 15 anni viene portata in ospedale con una diarrea acuta che perdura da 4 gg. Appare molto disidratata.

| pH | 7.31 | |
|---|---|---|
| $PCO_2$ | 32 | |
| $HCO_3^-$ | 16 | |
| Azotemia | 60 | Aumentata perché disidratata |
| Creatinina | 3.3 | |
| Gap Anionico | 20.2 | |

*(N.d.R Fa una digressione. Non sembra convinta sul valore del Gap Anionico. Sostiene che lo avrebbe detto più basso, intorno ai 16 poiché vi è una diarrea acuta con perdita di acqua, sodio, potassio e bicarbonati. Si crea ipovolemia e quindi riassorbimento renale prossimale di $Na^+$ come NaCl non con i bicarbonati, perduti per via intestinale come dimostra l'acidosi. C'è riduzione della volemia efficace del rene per cui si instaura un meccanismo di* ***iperaldosteronismo secondario***, che promuove la perdita di $K^+$ e $H^+$ a livello renale. *C'è infatti una pompa promossa dall'aldosterone che, a livello distale, riassorbe il $Na^+$ e fa uscire il $K^+$ e $H^+$. La perdita di $H^+$ per questa via favorirebbe un'alcalosi ma il fenomeno prevalente è la perdita di acqua e bicarbonati che crea* ***acidosi metabolica a gap quasi normale*** *la cui causa è la perdita della componente metabolica (bicarbonati) per via intestinale.)*

*N.B*=Le secrezioni intestinali, come pure quelle biliari, sono alcaline!

**5)** Abbiamo un uomo di 45 anni con cirrosi epatica esotossica scompensata. Presenta ascite, edemi declivi e subittero.

| | | |
|---|---|---|
| pH | 7.49 | |
| $PCO_2$ | 43 | |
| $HCO_3^-$ | 33 | |
| $PO_2$ | 62 | |
| Albumina | 29 | aumentata |
| globuline | 48 | aumentate |
| bilirubina | 2.4 | aumentata |
| Na urinario | 10 | Poco, ritenzione |
| K urinario | 35 | Aumentato |
| BE | +10 | |
| sodio | 128 | |
| potassio | 3 | |
| bicarbonati | 33 | |
| cloro | 100 | |

Ilpotassio urinario aumentato perché probabilmente c'è ritenzione aldosterone dipendente di sodio da una parte ed escrezione di potassio.

Lieve alcalosi metabolica con $PO_2$ bassa (ma non da dare ipoventilazione) e $PCO_2$ entro i range. E' **alcalosi metabolica normocloremica.**

Caratteristiche cirrosi: (digressione…)

-diminuita sintesi albumine = fegato non sintetizza abbastanza albumine ; né deriva un liquido intraperitoneale

-ipertensione portale = è chiaro che del liquido scappa fuori

questi due fattori contribuiscono all'ascite

A livello del tubulo prossimale c'è riassorbimento di sodio cloro per la diminuita volemia arteriosa efficace . Si attiva anche qui il sistema renina angiotensina aldosterone con meccanismo secondario . Allora si ha un esaltato scambio di sodio contro potassio e contro $H^+$ ;c'è ipopotassemia da cui deriva un'alcalosi metabolica perché insieme al potassio viene scambiato $H^+$ e quindi si perde $H^+$ e c'è alcalosi metabolica. Se c'è un ipertensione portale questo può derivare anche da un ridotto metabolismo epatico dell'ADH. ADH si attiva , aumenta e attiva il riassorbimento di acqua dal tubulo distale a livello del tubulo collettore . Da questo aumentato riassorbimento di acqua per azione dell'ADH si ha un fenomeno tipico della cirrosi, l' iponatremia da diluizione.

Quindi tre punti chiave:

- - ipoalbuminemia che sono responsabili della pressione oncotica

- -ascite

- -ipertensione portale = tutto il sangue confluisce nella vena porta

Quindi c’è riduzione della volemia efficace del rene con aumentato riassorbimento sodio cloro a livello del tubulo prossimale e con attivazione dell’aldosterone che porta ad alcalosi metabolica. L’aldosterone scambia il sodio contro il potassio a livello del tubulo distale, K e H escono insieme contro il sodio che resta dentro. Poi dopo abbiamo che l'ADH non viene più metabolizzato , si attiva e l’acqua libera viene trattenuta causando iponatremia da diluizione .

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 18/4/2013 (1)

---

Lezione di Metodologia Clinica 18/04/2013

Docente: dr.ssa Martina Montagnana â€‹â€‹â€‹â€‹â€‹
Sbobinatore: Anna Milani
Revisore: Andrea Benetti

IL LABORATORIO NELLA GESTIONE DELLA PATOLOGIA DIABETICA
Suddivisione della lezione in 4 parti:
1.Esami per la Diagnosi di diabete mellito: FPG, OGTT, HbA1C
2. Monitoraggio del diabete: HbA1C (Emoglobina glicata), POCT (Glucometri)
3. Monitoraggio complicanze croniche: nella nefropatia diabetica quindi (Micro)albuminuria (dosaggio della concentrazione di albumina nelle urine) e Stima GFR (eGFR)
4. Diabete Mellito Gestazionale (in gravidanza)
slide 3 parte prima

LA DIAGNOSI DI DIABETE MELLITO
Sino al 2009 esistevano solo tre criteri per farne la diagnosi:

1) FPG (Fasting Plasma Glucose = glicemia plasmatica a digiuno)
Per digiuno si intende un'assenza di introito calorico da almeno 8h

2) SINTOMI DI IPERGLICEMIA, ed in più una Glicemia casuale superiore ai 200mg/dl
Per sintomatologia si intende poliuria, polidipsia e perdita di peso (sono i tre sintomi classici);

3)durante una OGTT (curva determinante ) alla seconda ora una concentrazione di glicemia plasmatica superiore a 200 mg/dl

dal 2010 in poi è stato introdotto un altro criterio, che è stato messo al primo posto:

4) un valore di emoglobina glicata (A1C) ≥al 6,5%
Fino al 2010 la glicata veniva usata solo per il monitoraggio del paziente diabetico.

In dettaglio i 4 criteri:
1) A1C ≥6,5% (48mmol/mol)
L' American Diabetis Association, che si occupa di questa patologia e di definirne le direttive di esecuzione dei relativi test, stabilisce che il test deve essere eseguito presso un laboratorio che utilizzi un metodo NGSP certificato e standardizzato al DCCT.
Da quest'anno(2013) tutti i laboratori sono obbligati a refertare l'A1C con l'unità di misura espressa in mmol/mol, non più in percentuale.

**Che cos'è l'A1C(emoglobina glicata)?**
L'Hb dell'adulto si divide in grosse frazioni: HbA, HbA2, HbF, costituite da diverse catene globiniche. La HbA è formata da 2catene alfa+2catene beta, ma una piccola frazione dell'HbA è data dall'HbA1C, cioè quella glicata.
In un soggetto normale, il valore di A1c= 4-5,6% (20-38 mmol/mol).
Per fare diagnosi di diabete il valore deve essere superiore a 48mmol/mol
Da cosa dipende la quantità di A1C che si forma?
Dalla concentrazione di glucosio presente nell'organismo, e dalla durata dell'esposizione. Pertanto, quanto più sarà il glucosio, tanto più sarà la A1C.
La glicazione dell'emoglobina dipende dall'emivita dei globuli rossi (120 giorni). Tutte le patologie che alterano tale emivita, riducendola, causano una sottostima dell'A1C, che perciò non sarà più un parametro affidabile per fare diagnosi di diabete.
Come si forma l'A1C? (diapo.8)
Il glucosio si addizione in modo non enzimatico all'estremità N-terminale dell'HbA- cat.beta, si forma una Pre-Hbglicata, con emivita brevissima, e successivamente si forma la chetoammina: HbA1c.

Perché il cut off è stato fissato a 48mmol/mol?
In base a rilevanti studi (DCCT condotto su pazienti diabetici di tipo 1, e l'UkPDS su pazienti diabetici di tipo2), si è constato come a valori uguali o superiori alla soglia del 6,5% ci sia un aumento della prevalenza della retinopatia diabete-specifica (microangiopatia soprattutto).
Cosa significa che il metodo debba essere standardizzato in base al DCCT?
Affinché il dato dell'HbA1c sia universalmente utilizzabile, occorre che le misure siano standardizzate, ed in quest'ottica dal 1995 la Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha promosso le attività di un gruppo di lavoro che affrontasse il problema (IFCC WG HbA1c).
Standardizzazione: "creazione di sistemi di misura uniformi e riproducibili al fine di assicurare precisione, accuratezza, specificità, e armonizzazione dei risultati" . In questo modo, i risultati che si ottengono in un laboratorio potranno essere attendibili e confrontabili con quelli di un altro centro. A tal fine, L'ADA ha creato un gruppo di lavoro per la certificazione dei vari metodi diagnostici utilizzati nel mondo, e li ha standardizzati secondo il metodo NGSP.
Nella refertazione, sino ad un anno fa, la concentrazione era espressa sia in %, sia in mmol/mol. Dal 2013 è d'obbligo solo il mmol/mol; quindi nel referto si troverà scritto che il livello decisionale per la diagnosi di diabete sarà di 48 mmol/mol.

Quali sono i vantaggi dellHbA1c rispetto agli altri criteri? (diapo.15)

Riguardo al terz'ultimo punto, nel caso in cui un paziente arrivi in pronto soccorso, nonostante abbia mangiato un'ora fa, e si desidera conoscere se è affetto da diabete, posso effettuare questo esame, poiché non è necessario essere digiuni.

La minor variabilità biologica è un vantaggio perché
• Si definisce variabilità biologica intraindividuale (CVi) la fluttuazione casuale di un costituente dell'organismo, misurato in tempi diversi nello stesso individuo, intorno al suo punto omeostaticoDa un giorno all'altro e da un  momento all'altro,a parità di condizioni, i nostri analiti presentano una variabilità biologica. La  CVi dell'HbA1c è inferiore alla glicemia, per cui è più facile monitorarla
• La variabilità biologica interindividuale (CVg) è la nei risultati dello stesso costituente ottenuti in individui diversi, tutti nelle stesse condizioni fisiologiche, dovuta alla diversità dei punti omeostatici tra questi individui.

slide 17

E questi limiti sono stati  evidenziati in alcuni articoli, pubblicati su PubMed in cui si denota l'impossibilità di utilizzo in tutti i paesi per la diagnosi di diabete mellito.

Con  quali metodi si studia l'A1c?
 HPLC (Cromatografia liquida ad alta prestazione): separa le diverse frazioni emoglobiniche sulla base delle differenze di carica, ottenendo dal cromatogramma (lo strumento) una serie di picchi corrispondenti alle diverse frazioni emoglobiniche. Il primo picco in diapo.21 è quello della Hb glicata.

2) La FPG( Fasting Plasma Glucose)

Glicemia plasmatica a digiuno!

Spesso, anche all'esame, viene detto: "una glicemia superiore a 126 mg/dl". È diverso misurare la glicemia su sangue intero o su plasma o sugli eritrociti o su plasma.
La peculiarità per fare diagnosi di diabete è il digiuno da ALMENO 8 ore e il fatto che la Glicemia sia PLASMATICA (non su siero,..).
I problemi legati al dosaggio della glicemia:
-La glicemia risente della dieta introdotta
-non esistono delle metodiche standardizzate in tutti i laboratori
-risente delle variabili preanalitiche ( glicolisi: ogni ora la glicemia si riduce del 10%; se il prelievo giunge dal reparto in laboratorio dopo 3 ore, è già alterato)
-delle variazioni di secrezioni ormonali giornaliere (insulina, glucagone, cortisolo,..). sarà quindi ben diverso il valore misurato alle 18:00 rispetto alle 9:00.
Per questo le linee guida definiscono che il prelievo secondo il gold standard debba essere eseguito tra le 7:00 e le 9:00 del mattino, a digiuno da almeno 8 ore e su plasma. Nel pomeriggio, infatti, risulta inferiore del 5% a quella del mattino, alle 18:00 invece c'è un picco!
Non bisogna quindi fare il prelievo al pomeriggio.
La matrice biologica da usare è il plasma. Per cui dal prelievo venoso (sangue intero) si centrifugherà per ottenere il plasma. C'è una variazione della concentrazione di glucosio nelle diverse matrici perché è diversa la concentrazione di acqua nelle varie matrici.negli eritrociti infatti, la qiuantità di acqua sarà minima, e sarà maggiore nel plasma, dove infatti si scioglie il glucosio. La molalità del glucosio (quantità di glucosio per unità di massa d'acqua) è costante. Quello che cambia è la quantità di acqua (solvente): la quantità di acqua nel plasma è più alta dell'11% rispetto al sangue intero. La concentrazione di glucosio nel plasma è 11% maggiore rispetto al sangue intero.
3) ESECUZIONE DI UNA OGTT (Oral Glucose Tolerance Test)

slide 27

Ha delle controindicazioni: slide 27

Per la i), il paziente potrebbe andare in coma iperglicemico! Perchè si somministra un carico di glucosio.

Se il pz. prende Farmaci che alterano la glicemia, ha infezioni o altre situazioni che la possono alterare, il test sarà fatto solo quando sarà guarito.
**L'OGTT richiede una preparazione del paziente nei tre giorni precedenti all'esame: slide 28**

**Come si esegue un'OGTT?**

Prelievo per la misurazione di una FPG; se il valore è inferiore ai 126 mg/dl, si può somministrare al paziente il carico di glucosio e proseguire con il test.v
Se invece il valore è maggiore, devo sospenderlo.v
Se è il primo valore patologico che si trova, si chiede al paziente di ritornare tra una settimana, per ripetere il tutto, ma se ha già un precedente valore patologico, con quest'ultimo ottenuto si può già fare diagnosi di diabete mellito.v

NB: TUTTI QUESTI CRITERI, tranne uno, DEVONO ESSERE RIPETUTI SUCCESSIVAMENTE PER ESSERE CONSIDERATI ATTENDIBILI.

slide 31

Se il valore è quindi inferiore a 126 mg/dl, somministro il glucosio al paziente. Quanto?
Adulti: 75g disciolti in 300ml d'acqua ca.
Bambini: calcolo in base al peso corporeo: 1,75g x kg di peso. Fino ad un massimo di 75g (bimbi obesi).
La soluzione va assunta a temperatura ambiente, da seduto, in 5min circa.
Dovrà poi aspettare due ore, prima di eseguire il secondo prelievo.
Se il paziente impiega più di 10-30 min per berlo, dopo le due ore una parte sarà già stata metabolizzata, non ci sarà più una standardizzazione del test. Il paziente va controllato: deve rimanere seduto davanti all'ambulatorio, senza muoversi, non deve vomitare (bevanda assai zuccherina; in caso si sospende tutto e si ripeterà un altro giorno) altrimenti una parte del carico di glucosio verrà espulsa, non deve camminare in giro per l'ospedale o comunque fare attività fisica per non aumentare la velocità del metabolismo.

Nei soggetti normali la glicemia è inferiore a 100mg/dl a digiuno.
Identificazione di categorie a rischio durante OGTT
FPG tra 100 e 125 mg/dl:IFG- Impaired fasting glucose (=Alterata glicemia a digiuno)v
Sotto i 140mg/dl il paziente risulta sano mentre sopra i 200 mg/dl sarà diagnosticato diabete. Se dopo le due ore dall'OGTT la Glicemia plasmatica è tra 140 e 200 mg/dl: IGT- Impaired glucose tolerance (=Ridotta tolleranza glucidica).v
Con queste definizioni, si può capire che il paziente è in uno stato di pre-diabete, in borderline (equivalente di HbA1c = 39-47 mmol/mol). Pertanto, sarà monitorato nel tempo, prestare attenzione alla dieta e all'attività fisica.
Quando un soggetto apparentemente sano deve sottoporsi a questi esami?
Le linee guida definiscono così:
Adulti con Body Mass Index maggiore di 25 kg/mq e con uno o più fattori di rischio,

indipendentemente dall’etàv
 In assenza di tali fattori di rischio, dai 45 anni in poi. Se i risultati sono normali, saranno eseguiti dei test ogni 3 anni.v

IL MONITORAGGIO
Nel monitoraggio, ovviamente, si considerano pazienti a cui è già stato diagnosticato il diabete.
L’esame cardine è l’HbA1c. ogni quanto va misurata?
Questo parametro, come dice l'ADA, dovrebbe essere misurato almeno 2 volte l’anno nei pazienti che hanno buon controllo metabolico raggiunto l’obiettivo terapeutico e con un controllo glicemico stabile.
In caso contrario, o quando vi sono variazioni della terapia ipoglicemizzante, i controlli devono essere più intensi (ogni 3 mesi). Misurazioni più frequenti non hanno senso perché l’emoglobina glicata è correlata all’emivita degli eritrociti, quindi circa 120 gg. Spesso, il laboratorio riceve molte richieste inappropriate, tipo l'analisi dell'hbA1c ogni giorno nel medesimo paziente!! È un costo inutile!
In base ai valori di HbA1c:
• 4-5.6%: soggetto “sano”
• >6.5% (se ripetuto): diagnosi Diabete Mellito
• 5.7-6.4%: “pre-diabete”
Nel Diabetico, gli obiettivi cambiano, e posso affermare che il paziente ha:
• 6.1-7% (43-53 mmol/mol) buon controllo metabolico
• 7.1-9% (54-75 mmol/mol) mediocre
• >9% (75 mmol/mol) cattivo

Cosa sono i POCT( Point Of Care Testing)? Sono i  glucometri, usati esclusivamente per il monitoraggio. Non per fare DIAGNOSI, (es.: glicemia misurata in farmacia ad un individuo sano), perché:
 Rileva la glicemia nel sangue INTERO capillare, non su sangue venoso o arterioso. (la misurazione con glucometro consiste in una lancetta che punge il polpastrello, la goccia di sangue che esce è dal capillare, intero, poichè non è stato centrifugato). Perciò è una glicemia diversa da quella ottenuta da plasma venoso.Ø
Le linee guida dell'ADA definiscono che sono strumenti per mantenere sotto controllo il valore glicemico,esclusivamente per il paziente diabetico. Il glucometro, infatti, oltre al controllo, permette di prevenire le ipoglicemie, molto più gravi delle iperglicemie, perché portano al coma. È per questo fondamentale monitorarlo durante l'intera giornata. Inoltre, consente di evitare l’iperglicemia e di regolare lo stile di vita. Questi controlli sono fatti, prima, dopo i pasti, attività fisica,.. per cogliere eventuali cali o picchi della glicemia.
Le linee guida della società italiana di diabetologia (SID) affermano che l’autocontrollo quotidiano (almeno 3-4 controlli/die) è indispensabile per la persona con DIABETE TIPO 1 in terapia insulinica intensiva. (Livello della prova II, Forza della raccomandazione A)
L’autocontrollo glicemico continuativo, con frequenza e modalità diverse, è utile per la persona con DIABETE TIPO 2 insulino-trattato. (Livello della prova III, Forza della raccomandazione B)
L’autocontrollo glicemico non continuativo è potenzialmente utile per la persona con DIABETE TIPO 2 in terapia orale o dietetica, ma non sono disponibili chiare evidenze di efficacia sul controllo glicemico (Livello della prova VI, Forza della raccomandazione C).
La ripercussione sul soggetto diabetico di tali linee guida riguarda il punto di vista economico. Lo stato passa le striscette reattive  solo ai pazienti insulino-trattati.
Fondamentale: L’accuratezza di questo strumento è STRUMENTO-UTILIZZATORE DIPENDENTE.
Il medico deve insegnare al paziente come usarlo correttamente, onde evitare risultati alterati. Le linee guida dicono di valutare la tecnica utilizzata dal paziente sia inizialmente che ad intervalli

regolari. Il paziente deve anche saper interpretare i dati. Anche questa capacità deve essere rivalutate periodicamente ( soprattutto se il paziente è anziano). Esiste una vasta gamma di glucometri (marche, dimensioni, modelli, ecc). I risultati ottenuti comunque non sono accurati come quelli di laboratorio poiché ci possono essere striscette alterate o mal conservate, errori legati all'utilizzatore, lo strumento non è ben calibrato, non viene fatto il controllo qualità dello strumento, per alterazioni con altri farmaci,che interferiscono con il sistema di misurazione del glucometro, o anche per variazioni di livelli di ematocrito del soggetto, causando falsi positivi e negativi, rispettivamente in pazienti con Ht molto basso o molto alto.
Inoltre, alcune banalità (che però non sempre sono rispettate, tantomeno dagli infermieri):
-lavare le mani con sapone prima dell’esecuzioni,
- mani asciutte (per non rischiare di diluire il sangue),
- circolazione capillare ben conservata, puntura del dito lateralmente (perché al centro del polpastrello ci sono le terminazioni nervose e alla lunga -30anni- si potrebbe perdere sensibilità),
- no uso di alcool (evitare emolisi e diluizioni).
-Ago conforme alle cute (neonato-anziano), e profondità di puntura (più profonda nell'anziano perchè la cute è più spessa).
-la striscetta reattiva va posta lateralmente alla goccia di sangue in modo che sia essa stessa ad assorbirla. (non sopra, altrimenti sporcandosi la striscetta, ci saranno problemi per la valutazione)
-possono essere usate altre sedi di prelievo: lobo, avambraccio volare, ma mai per prelievo postprandiale, poichè l'incremento di glicemia non sono rilevati in questi siti alternativi. Nei polpastrelli la circolazione superficiale è di 7 volte superiore rispetto all’avambraccio: il dato è più “aggiornato”.
-la glicemia non va determinata dopo l’assunzione di dolci, o averne toccati (zucchero, anche fruttosio, sulle mani!)
-Le striscette hanno data di scadenza,devono essere conservate a temperatura ambiente (non nel cruscotto in macchina! Le elevate temperature d'estate (40-50*) possono causare scostamenti anche molto significativi rispetto al dato reale )
- altri fattori preanalitici sono tutte le condizioni di riduzione della pressione a livello capillare.(es: stati di shock o anche sindrome di Raynaud in cui potremmo avere una circolazione non efficace a livello capillare)

Riguardo al valore di ematorcrito, se esso è alto la glicemia plasmatica sarà bassa, e viceversa.
1. Gli eritrociti nella goccia di sangue intero capillare possono alterare il rapporto tra il glucosio nel sangue intero e quello nel plasma
2. Impedimento meccanico da parte dei globuli rossi che impediscono l’ingresso della parte liquida nella striscia o ne diminuiscono la quantità (alterata viscosità), dando una sottostima.
Le striscette oggi in uso sono influenzate significativamente  solo da valori molto alterati.
Alcuni farmaci alterano l’Ht se somministrati a dosi molto elevate e frequenti: maltosio, acido ascorbico e il paracetamolo.
Si deve inoltre prestare attenzione alla manutenzione dello strumento (batteria carica, non danneggiato, pulito,...) e la sua calibrazione(taratura, cioè mettere in rapporto il segnale elettronico fornito dallo strumento con la grandezza che si intende misurare) procedura semplice ma fondamentale.
La calibrazione consiste di solito nell'inserire un codice, o un microchip, o delle striscette autocalibranti (in base al modello), ma spesso non viene eseguita questa procedura dal paziente, non essendogli stata spiegata l'importanza. Per questo, negli ultimi anni sono stati inventati strumenti che ad ogni accensione si autocalibrano!! :)
Il GLUCOMETRO VA CONOSCIUTO. Spesso quando cambia il lotto delle strisce, varia anche il codice di calibrazione, e per tale motivo è indispensabile rieseguirla. Ultimamente, alcune ditte forniscono un unico lotto di striscette!! :)
Il controllo di qualità ne garantisce la precisione (attraverso striscette o soluzioni), e va eseguito

periodicamente sullo strumento. Esso consiste nell'inserire delle striscette di controllo nel glucometro,e il valore risultante deve essere compreso in un dato range, per accertarne la precisione. Oppure esistono le soluzioni di controllo, cioè flaconcini con fluidi che simulano il sangue del paziente, e usando la striscetta, il valore risultante deve rientrare sempre in un dato range. Il controllo di qualità, come determinato dalle linee guida, va eseguito al primo utilizzo dello strumento, ogni volta che si apre un pacchetto nuovo di striscette reattive, se c'è sospetto di aver rovinato lo strumento, se è caduto,..deve quindi essere ripetuto nel tempo.
Ogni tanto verificare l'allineamento tra i dati del prelievo venoso in laboratorio e del glucometro a domicilio (il confronto con i dati antecedenti devono essere nel medesimo rapporto, per es: entrambi raddoppiati). Il paziente quando va a fare un prelievo in ospedale, porterà con sè il proprio glucometro, per ripetere con esso il prelievo, paragonando subito i dati. In genere, questo non viene fatto quasi mai, perchè il paziente effettua il controllo in laboratorio solo quando rileva valori enormemente sballati.

MONITORAGGIO delle COMPLICANZE CRONICHE
IL DIABETE COMPORTA DUE TIPOLOGIE DI COMPLICANZE:
**Macrovascolari** (grossi vasi)
• Cardiopatia ischemica (infarto miocardico, angina, scompenso cardiaco)
• Malattia cerebro-vascolare (ictus, TIA = attacchi ischemici transitori)
• Arteriopatia periferica (gangrena, amputazioni) in fase avanzata di malattia.
**Microvascolari** (piccole arteriole)
• Retinopatia (porta a cecità)
• Nefropatia (porta a Insufficienza Renale Cronica) L'UNICA MONITORATA DAL LABORATORIO- non esistono esami per monitorare tutte le altre complicanze diabetiche.
• Neuropatia (piede diabetico)
• Complicanze gravidanza (soff. fetale, mortalità perinatale)

**La nefropatia diabetica**
Nel soggetto non diabetico: la maggior parte dell'albumina filtrata torna nel sangue intatta. Solo <5% viene degradata dai lisosomi cellulari in piccoli frammenti peptidici (<5000 daltons) che entrano nelle cellule tubulari per essere poi escreti nelle urine.
Nel diabetico: alterazione della membrana glomerulare, diminuiti livelli di proteoglicani con conseguente riduzione di cariche negative e ridotta selettività della barriera glomerulare. Glicosilazione albumina circolante con alterazione della carica della stessa. Diminuito re-uptake albumina a livello tubulare. L'escrezione urinaria di albumina pertanto aumenta.
La quantità di albumina urinaria permette di vedere il danno renale quando già non c'è un danno irreversibile, cioè un'insufficienza renale cronica complicata. Nella nefropatia preclinica, sia gli esami ematici che urinari sono negativi, cioè non si rilevano danni, nella incipiente si rileva una iperfiltrazione, microalbuminuria e ipertensione, quindi aumenta la secrezione di albumina nelle urine. in quella conclamata invece, aumenta notevolmente il livello di albumina urinaria, aumenta la creatinina plasmatica e diminuisce la GFR, cioè riduzione del filtrato glomerulare.
I due esami di laboratorio che si fanno per monitorare la malattia sono la microalbuminuria e la valutazione della GFR, che però non viene misurata, bensì STIMATA (infatti, eGFR significa estimatedGFR!!!)

slide 5 parte terza

**LA MICROALBUMINURIA**

Esistono degli strumenti per prevenire il danno renale provocato da microalbuminuria, che quindi deve essere diagnosticata per tempo. Sapendo che un paziente presenta microalbuminuria si potranno prendere dei provvedimenti per evitare la nefropatia. Questi mezzi sono:

**Microalbuminuria è un termine scorretto**: si potrebbe pensare alle ridotte dimensioni dell'albumina, in realtà si intende la sua quantità, la misura della proteina nelle urine, per l'accertamento della nefropatia diabetica.( Ma i clinici sono legati a questo termine.) Essa ha lo scopo di evidenziare abbastanza precocemente lo sviluppo della nefropatia in fase ancora reversibile.

**Quando si esegue l'esame**? Annualmente nei pazienti con diabete di tipo 1 con durata della malattia da più di 5 anni, e in tutti i pazienti con quello di tipo 2. Non è sufficiente un unico dosaggio. In sei mesi devono essere raccolti 3 campioni di urine. Se risultano essere positivi in 2 su 3 , posso dire che il paziente ha un danno renale. Nel caso in cui ne fosse positivo solo uno, probabilmente potrebbe essere un falso positivo, perché il paziente potrebbe avere infezioni in quel momento, per un danno acuto, ematuria, o altre interferenze. Devono essere pertanto usate come campione le urine fresche (meglio del primo mattino), non serve la raccolta nelle 24h.
Si definisce microalbunuria quando nelle urine l'albumina è compresa tra 30-299 µg/mg di creatinina. Se supera i 300: macroalbuminuria (albuminuria franca) e significa che la nefropatia è già conclamata. Clinicamente sarà possibile solo la dialisi.

**LA GFR (capacità filtrante globale del rene) v**

GFR= velocità di flusso (o più semplicemente il flusso) del liquido che viene filtrato attraverso il rene (dai capillari glomerulari alla capsula di Bowman) cioè quantità di filtrato glomerulare prodotta nell'unità di tempo, ml/min
Dipende da:
1. Numero di glomeruli funzionanti
2. Pressione di filtrazione
3. Struttura della membrana del glomerulo

È il miglior indice per valutare la funzionalità renale.
La GFR può essere CALCOLATA misurando una sostanza che si trova ad una concentrazione stazionaria nel sangue, filtrata dal rene, che quindi sarà nelle urine, ma né assorbita, né secreta attivamente dal rene. Per questo dovremmo disporre di un marcatore, facilmente dosabile, che viene rilasciato in costantemente nel sangue, totalmente filtrato dal glomerulo, ma che non viene assolutamente riassorbito né secreto a livello dei tubuli renali, e che viene eliminato solo dal rene.
In passato, la sostanza con tutte queste caratteristiche usata era l'inulina, infusa in vena, raccolta delle urine, e poi misurata quanto ne veniva escreta. Se la filtrazione glomerulare del paziente era buona, se ne ritrovava quasi l'intera quantità, altrimenti una parte rimaneva nel circolo sanguigno, e quindi il suo livello nel plasma risultava aumentato. Poichè richiede molto tempo, ed è un metodo costoso, oggi non è più utilizzato.
Altri marcatori radioattivi sono stati impiegati successivamente, sempre iniettati, però sono stati abbandonati in quanto pericolosi, e perchè richiedevano molto tempo ed erano parecchio costosi.
Sono stati creati degli esami surrogati per avere una STIMA del GFR. Ad es. la clearance della creatinina espressa in ml/min.
Come si effettua il test:
si definisce la quantità di creatinina urinaria in mg/dl,
si determina il volume urinario del pz nelle 24h,
e la si divide per la misurazione della creatinina sierica (mg/dl)

**Svantaggi**:

esame che richiede un'adeguata idratazione e la raccolta delle urine nelle 24h,
è un indice che sovrastima la GFR perché riflette la somma di creatinina escreta per via glomerulare (però una parte è escreta anche per via tubulare) per cui ci sarà una sovrastima.
Per questo è un esame usato solo per decidere se iniziare o no la dialisi.

**LA CREATININEMIAv**
Un altro parametro per valutare la funzionalità renale è la creatinemia, cioè la creatina presente nel siero. Esiste una relazione tra creatinina e GFR: all'aumentare della prima nel siero, dimunisce la seconda. Il valore normale di GFR è >60 ml/min ( in realtà un soggetto non ha problemi, se il valore è maggiore di 60, ma il tasso normale sarebbe di 90 ml/min).

**Svantaggi:**
1. non c'è andamento lineare, ma la creatinina è caratterizzata da una bassa sensibilità; essa si alza quando già nel paziente c'è un danno cospicuo renale, superiore al 50%.
2. La misurazione e produzione di creatinina risente di alcuni fattori legati al soggetto: età, sesso ( femmine più basso), massa muscolare(valore più alto quanto più il soggetto è muscoloso), dieta (valori più alti per i vegetariani).
3. Secrezione glomerulare e tubulare.

Nessuno degli indici presentati finora è soddisfacente.

L'indice utilizzato nei laboratori è perciò la eGFR( GFR estimated)
Negli anni sono state create diverse equazioni per suddetta stima. Oggi si usa la MDRD ( nome dello studio dove è stata creata) condotto su 1628 pazienti, e convalidata su altrettanti.
Essa tiene conto del valore sierico di creatinina, dell'età, del sesso, della razza.

**Debolezze:**
no nei soggetti minori di 18 anni e superiori di 75 anni (perchè non è stata validata nei soggetti anziani).
Gli studi non avevano incluso individui sani, ma solo con malattia cronica. Per questo le linee guida stabiliscono che nei referti debba essere indicato il valore di GFR solo se è inferiore ai 60 ml/min, altrimenti si referta solo con 'valore superiore a 60'.
Ovviamente tutte queste equazioni non sono accurate e subiscono modifiche se applicate a popolazioni diverse da quelle studiate. Si ricordi che queste equazioni hanno lo scopo di stimare la GFr in base al rapporto tra il valore sierico del marcatore creatinina e il GFR misurato in una popolazione di riferimento studiato. In quei pazienti studiati, è stato misurato il glutammato ecc, e si è creata l'equazione per poter ottenere i valori stimati. Quindi oggi Si misura la creatinina sierica e lo si applica all'equazione, e si induce il risultato stimato della GFR, facendo pertanto una misurazione indiretta.

**DIABETE MELLITO GESTAZIONALE**

È un'intolleranza ai carboidrati, di vario grado e severità, con inizio o primo riconoscimento durante la gravidanza. COMPARE CON LA GRAVIDANZA! Se la donna in gravidanza è affetta da un diabete di tipo 1 o 2, non è un diabete gestazionale.
È importante diagnosticarlo perché:
• per il nascituro: macrosomia fetale, ipoglicemia neonatale. Il neonato sarà tenuto sotto controllo.
• per la donna: importante fattore di rischio per lo sviluppo del diabete mellito di tipo 2 dopo la gravidanza. Nelle donne con pregresso GDM: frequenza di DM 2 del 26% in donne normopeso e del 47% in donne obese.

Quante donne sono colpite dal diabete  gestazionale? Circa il 7% con un range che varia dall'1% al 14% a seconda della popolazione studiata.
Viene diagnosticato con 2 linee guida:
1. ADA: seguite da TUTTO IL MONDO
2. Italia: dal 2011 il sistema sanitario italiano si è creato delle linee guida, cambiandole da tutto il resto del mondo (per i tagli…)
La minicurva da carico: non viene più fatta!! slide 4 parte quarta

A 24 -28 settimane di gestazione tutte le donne sono sottoposte ad una OGTT curva a carico rapido di glucosio, non è però lo stesso effettuato nell'adulta non gravida. Si somministra sempre il glucosio, facendo non due misurazioni, cioè digiuno e dopo due ore, ma tre misurazioni: digiuno, dopo 1h, e dopo 2 h. **slide 6 parte quarta**

I cut off sono ovviamente diversi dall'adulta normale. Un valore al di fuori di questi cut off è sufficiente per dire che la donna ha un diabete gestazionale.

L'Italia si è pronunciata diversamente da queste linee guida. Se la donna ha almeno una delle seguenti condizioni:

La donna sarà sottoposta ad un OGTT a 16-18 settimane. Si usano però gli stessi cut off, costruiti però su donne con curva da carico eseguita alle 28 settimana di gestazione. L'Italia avrebbe dovuto condurre uno studio  per certificare che alla 16-18esima settimana le glicemie sono le stesse, con i medesimi cut-off, dato che in gravidanza le glicemie cambiano ogni settimana, perché il glucosio del bambino cambia con la sua crescita..ma ovviamente ciò non è stato fatto..
Se il cut off risulta normale, la donna deve ripetere una seconda OGTT a 28 settimane!!
Se la donna ha una delle suddetti fattori di rischio, le si offre l'OGTT a 24-28 settimane.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 2/5/2013 (1)

---

MEDICINA DI LABORATORIO

Lezione del 02/05/13

Professore: Lechi

Sbobinatore: Alessia Pretto

**ANALISI DEL SEDIMENTO URINARIO**

L'unità nefronica è l'unità funzionale del rene attraverso cui l'ultrafiltrato plasmatico si concentra e cambia la sua composizione, fino ad assumere le caratteristiche tipiche dell'urina.

A livello del tubulo distale, l'azione dell'ormone aldosterone che determina il riassorbimento $Na^+$ contro $K^+$, quindi c'è ipopotassiemia, e $H^+$. Quindi c'è una alcalosi ipopotassiemica metabolica perché vengono perduti $K^+$ e $H^+$ . A livello del tubulo collettore agisce l'ormone adiuretina, secreto dall'ipotalamo, che fa riassorbire acqua nell'interstizio, per cui l'azione dell'ADH nell'unità nefronica è quella di concentrare l'urina. Quindi livelli bassi o nulli di ADH o del rispettivo recettore un'accentuata poliuria

### Rene ed emocromo

Si riscontra una forte correlazione tra l'azione ormonale del rene e l'emocromo. Conseguenza pratica diretta di un'anemia è l'emoglobinopenia e quindi un diminuito trasporto di ossigeno ai tessuti (ipossia). Questa condizione patologica stimola a livello renale la produzione dell'ormone eritropoietina, che agisce sul midollo osseo aumentando la produzione di globuli rossi così da correggere l'anemia.

### Esame delle urine

<u>Esame fisico sull'urina liquida</u>:

Il primo passo è quello di fare un esame fisico (o ispettivo), poi si determina il peso specifico dell'urina ovvero il rapporto tra il peso di 1 cc di urina e il peso di 1 cc di acqua il quale sarà maggiore di 1 perché l'urina ha più sostanze disciolte rispetto all'acqua.

Test dei Dip Stick: sono piccoli test incorporati insieme che reagiscono con sostanze specifiche presenti nell'urina. La presenza della sostanza reagente determina un viraggio di colore direttamente proporzionale alla concentrazione della stessa. Esame risulta essere grossolano benché indicativo.

N.B. Gli anioni proteici dell'albumina se presenti in quantità superiori a 15 mg/dl inducono dissociazione dell'indicatore con viraggio del colore da giallo a blu, in funzione della concentrazione di albumina.

Ci sono alcuni falsi positivi. In presenza di blu di bromofenolo, le albumine ne inducono la dissociazione e si legano alle cariche positive del blu di bromofenolo. Il legame per le albumine dal dip stick, ha una sensibilità compresa tra 5 e 15 *(mg/L, ndr)* e quindi è in grado di valutare il danno glomerulare; mentre il test del blu di bromofenolo non è per niente sensibile alla presenza di proteine a basso peso molecolare.

<u>Esame del sedimento</u>:

Si fa centrifugare l'urina a giri bassi (1000-1500 giri/min.) determinando la separazione della porzione corpuscolare. Nel fondello si ritrovano:

- Cellule
- Cilindri

- Cristalli
- Batteri.

Raccolta del materiale:

La raccolta deve avvenire nelle prime ore del mattino così le urine sono più concentrate.

**Campione estemporaneo**: si ottiene raccogliendo il mitto intermedio dopo una accurata pulizia.

**Campione temporizzato**: raccolta di tutte le urine nell'arco di 12-24 ore successive a una minzione.

In ogni caso, terminata la raccolta il campione di urine deve inviato rapidamente al laboratorio, altrimenti è necessario conservarlo in frigorifero

Una corretta analisi delle urine deve essere fatta ad una distanza di tempo non maggiore di una o due ore (*dal prelievo del campione, ndr*) soprattutto per quanto riguarda il sedimento.

Comprende:

- un esame fisico
- un esame chimico
- un esame microbiologico
- un esame microscopico (riguarda cellule, cristalli, sali, batteri e sostanze contaminanti)

**Esame fisico**:

trasparenza, odore, volume e peso specifico.

**Colore**

il colore normale delle urine è giallo paglierino ed è dovuto ad urocromo e urobilina.

Colorazione anormali:

Rosso (più o meno intenso): presenza di emoglobina, mioglobina, porfobilinogeno e porfirine. Anche la dieta ed eventuali sostanze patologiche o farmacologiche fanno variare il colore dell'urina (es: bietole, rabarbaro, lassativi).

Arancio: a causa di pigmenti biliari, disinfettanti urinari e altri farmaci.

Giallo intenso: dovuta ad un'alta concentrazione urinaria o alla presenza di bilirubina. Anche l'assunzione di carote, vitamine e farmaci (fenacetina, lassativi, diuretici, tetracicline) possono determinare questa pigmentazione.

Verde: è dato da biliverdina e batteri (soprattutto lo Pseudomonas, un gram negativo).

Marrone: è dovuto a pigmenti biliari, mioglobina, ematina acida cioè sostanze in cui il gruppo eme è ossidato.

Nero: è dovuto a melanina,acido omogentisico, metaemoglobina (che ha il gruppo eme con il ferro ferrico), sulfamidici, levodopa e cascara.

Blu: è dovuto a disinfettanti urinari.

**Trasparenza**

Torbidità: è data da fosfati, carbonati e acido urico.

Aspetto lattescente: è dato da infezioni leucocitarie, piuria, cellule vaginali abbondanti e lipuria (metaboliti grassi che vengono eliminati).

Precipitati: fosfati, cristalli di acido urico, muco, leucociti e batteri.

**Esame standard dell'urina fisiologico**

Colore: giallo paglierino

Aspetto: limpido

pH: 5.5-7.5*

Glucosio: < 10 mg/dl

Proteine: < 15 mg/dl

Emoglobina (Hb): assente

Corpi chetonici: assenti**

Bilirubina: assente***

Urobilinogeno: 0.2 mg/dl

Peso specifico: 1010-1030

Esterasi leucocitaria: assente^

Nitriti: assenti^^

*Il rene è una delle vie con cui l'organismo si libera degli ioni $H^+$ ( ne elimina circa 100 mEq nelle 24 ore), l'altra via è il polmone.

**I corpi chetonici sono presenti nel diabete perché il metabolismo glucidico è compromesso, l'energia si ricava dagli acidi grassi e ne deriva la formazione di acetilCoA in eccesso. L'acetilCoA non può entrare nel ciclo di Krebs, che è compromesso dalla malattia diabetica, e quindi si formano i corpi chetonici: l'acetoacetil CoA, l'acetacetico e il suo prodotto di degradazione che è l'acetone.

I bambini spesso hanno l'alito cattivo che è dovuto all'acetone che indica che ci sono corpi chetonici in circolo. Questi corpi chetonici, se sono molti, sono responsabili di gravi acidosi metaboliche.

*** La bilirubina è una molecola apolare insolubile che si diventa solubile solo quando viene coniugata con l'acido glucuronico. A questo punto riesce a passare in circolo e a comparire nelle urine, conferendo un colore variabile tra il colore giallo scuro, l'arancio o anche il marrone.

^L'esterasi leucocitaria è un enzima contenuto nei leucociti. Un test di screening permette di rilevare la presenza di leucociti e quindi di piuria ( che indica una infezione del tratto urinario). Questo test è usato costantemente ed è anche abbastanza attendibile.

^^ I nitriti indicano la presenza di batteri. Infatti i batteri degradano i nitrati che vengono escreti con le urine, a nitriti.

Domanda: perché i bambini hanno spesso l'alito acetonemico?

Perché spesso stanno tanto a digiuno o hanno mangiato troppe sostanze grasse. In queste situazioni non si può più ricorrere al metabolismo glucidico, vengono metabolizzati gli acidi grassi con conseguente produzione di acetil CoA, il quale non riesce a inserirsi nel ciclo di Krebs. Due molecole di acetil CoA si condensano per formare l'acetoacetil CoA che è il precursore dei corpi chetonici e poi si idrolizza ad acido acetacetico, il quale si decarbossila formando l'acetone che è una sostanza apolare volatile.

**Sedimento urinario**:

cilindri " (comportano una grave malattia renale)

cristalli e sali ', materiale amorfo '

cellule epiteliali ‘, leucociti ‘, eritrociti ‘, batteri e lieviti ".

‘ in minime quantità

" sempre patologici

**Volume urinario**

Il volume delle urine aumenta (poliuria):

- Se si beve eccessivamente
- Assunzione di diuretici (ex. pazienti con edemi o con ascite (come i cirrotici))
- Mancanza di ADH (no produzione ipotalamo oppure recettori renali assenti o non funzionali)
- Nelle malattie renali croniche e nell'insufficienza renale cronica
- Nel diabete mellito, perché il glucosio nelle urine provoca una diuresi osmotica (poliuria a p.s. elevato)

Il volume delle urine diminuisce:

- Disidratazione (ex. Vomito, febbre alta o sudorazione eccessiva)
- Si beve poco. (fenomeno tipico negli anziani degenti)
- Malattie renali acute come la glomerulonefrite e la pielonefrite
- Malattie renali croniche in fase molto avanzata

L'anuria, cioè la mancanza di volume urinario si ha:

- Nell'insufficienza renale acuta
- Nello shock o collasso circolatorio
- Nell'ipossia renale

**Peso specifico**

rapporto tra il peso specifico in grammi di 1 cc di urina e 1 cc di acqua.

L'urina contiene varie sostanze, per cui il peso specifico urinario è sempre maggiore di 1.

Il peso specifico misura la capacità di diluire o di concentrare le urine. Un adulto normale ha un peso specifico che varia dai 1003 ai 1028 in funzione della diluizione o della concentrazione.

Se il peso specifico di un campione estemporaneo di urine è superiore a 1022-1023, indica che il soggetto ha una normale capacità di concentrazione.

Il peso specifico si ottiene con uno strumento che misura l'indice refrattivo, ovvero l'angolo con cui la luce è rifratta passando attraverso il liquido *(l'urina, ndr)*.

Il peso specifico aumenta in caso di :

- Disidratazione, per varie cause quali diarrea ,vomito, insufficienza cardiaca, restrizione idrica.

- Glicosuria (in soggetti diabetici)

- Proteinuria, cioè una perdita di proteine ad alto peso molecolare attraverso le maglie glomerulari

- Escrezione di mezzi di contrasto per RX.

Ogni volta che ci sono da fare esami per valutare la funzionalità renale (*credo volesse dire esami radiologici, ndr*), si esegue prima una azotemia e una creatininemia per vedere la funzionalità renale del paziente. Se questa non è buona, l'uso dei mezzi di contrasto da raggi potrebbe dare dei problemi al paziente.

- Ipersecrezione di ADH, aumenta il riassorbimento di acqua a livello tubulare e l'urina si concentra.

Il peso specifico urinario diminuisce in caso di:

- Diabete insipido centrale (assenza o bassi livelli di ADH) e neurogenico (per insensibilità del tubulo *(renale,ndr)* all'azione dell'ADH stesso)

- Glomerulonefriti e pielonefriti (la malattia implica un diminuito riassorbimento di acqua)

- Insufficienza renale grave, in cui i nefroni perdono la capacità di riassorbire acqua e producono un'urina a basso peso specifico (intorno a 1007-1010, che è praticamente il peso specifico del plasma). Questa condizione prende il nome di isostenuria ed esprime l'incapacità del rene sia di concentrare che di diluire le urine.

**Osmolalità urinaria**: n° di particelle osmoticamente attive/Kg di solvente (100-1200 mOsm/kg)

**Osmolarità urinaria**: n° di particelle osmoticamente attive / l di soluzione (VN 600-1400 mmol/l)

La prima è la più esatta perché si basa sul peso e non sul litro di soluzione *(volume di soluzione, ndr)* che è influenzabile da altri fattori quali ad esempio la temperatura.

In genere si usa un osmometro, il quale fornisce l'osmolalità in numero di particelle attive per chilogrammo di solvente e per questo si usa come principio fisico chimico il D di congelamento.

Quindi ad esempio se sappiamo che il plasma ha un D di congelamento di – 0.53, il valore che si legge all’osmometro corrisponde all’osmolarità della soluzione.

Se abbiamo una soluzione della quale vogliamo calcolare l’osmolarità, la mettiamo nell’osmometro e vediamo un valore di -0.7. Poi prendiamo il plasma che ha un’osmolalità compresa tra 290 e 300 mOsm/Kg, lo mettiamo nell’osmometro e vediamo un valore di 0.5. Se 200 mOsm di plasma danno 0.5 di osmolalità, X mi daranno -0.7. In questo modo avremo calcolato l’osmolarità della soluzione ignota.

Quindi ci sono due misure, una riferita al Kg e l’altra riferita al L di soluzione, di cui la prima misurabile con un apparecchio è molto più esatta della seconda.

Non sempre p.s. e osmolarità urinaria coincidono. Infatti, a parità di densità urinaria, osmolarità può essere:

- bassa: in caso di proteinuria
- elevata: in caso di glicosuria
- ancora più elevata: se l’urea rappresenta la componente pricipale, come di norma (insieme a $Na^+$, $K^+$, $Cl^-$)

Perché si verifica ciò?

Perché le proteine hanno un peso molecolare molto alto, per cui se si divide il peso in grammi di proteine per il loro peso molecolare (ad esempio 10/70000), il risultato è un numero di particelle proteiche molto basso. Se invece dividiamo il peso 10 per 180 (che è il peso molecolare del glucosio), risulta un numero più elevato. E se dividiamo per l’urea che pesa 60 avremo un’osmolarità ancora più elevata perché l’urea pesa meno di tutti. Quindi dividendo la massa per il peso molecolare, tanto più alta è l’osmolarità, quanto più basso è il peso molecolare della sostanza.

**Esame chimico**

**pH delle urine**

Compreso tra 5.5 e 7.5 e può variare per diversi motivi.

<u>pH alcalino</u>:

- Infezioni batteriche tratto urinario

- Dieta vegetariana

- Infezioni da stafilococco (frequentissime), Proteus, E. Coli e Pseudomonas. Sono tutti gram negativi in grado di scindere l’urea in ammoniaca e $CO_2$ inducendo urina alcalina.

- Alcalosi metabolica e respiratoria

- Ostruzione ureterale da calcoli che può produrre la scissione dell’urea in ammoniaca

- Contaminazione da detergenti o disinfettanti

pH acido:

- Dieta proteica

- Acidosi respiratoria notturna da ridotta ventilazione può rendere il pH più acido al mattino. Questo fenomeno succede soprattutto in pazienti che sono tendenzialmente sovrappeso e quindi di notte il diaframma si muove meno, perciò ci sarà una ridotta ventilazione con conseguente aumento della $pCO_2$ che rende il pH urinario più acido al mattino. È una situazione pericolosa perché a lungo andare può trasformarsi in una acidosi che si prolunga anche nella giornata. In reparto, i pazienti con dispnea notturna vengono trattati con un apparecchio collegato al naso che facilita l'eliminazione della $CO_2$ .

- Acidosi metabolica e respiratoria

- Sindrome di Bartter, che è una alcalosi metabolica ipocloremica con perdita di cloro. È una malattia rara che comporta un'incapacità di riassorbimento del cloro.

**Calcoli renali legati al pH urinario**

I calcoli presenti nelle urine alcaline sono composti da calcio fosfato, calcio carbonato, ammonio fosfato magnesiaco accompagnati da germi (Proteus, Stafilococco, Pseudomonas e Klebsiella).

Urine acide sono quelle che contengono acido urico, il quale può essere sottoforma di urati amorfi o sottoforma di cristalli.

L'acido urico ha un pK di 5.8 (il pK è quel pH al quale il tampone dissocia meglio). A pH inferiori al pK, l'acido urico esiste in forma indissociata insolubile che tende a precipitare. Lo ione urato invece, presente a pH alcalino è molto più solubile

[DIAPOSITIVA, Tabella che riassume i germi patogeni delle cistiti. Candida e miceti sono quelli riscontrati più frequentemente.]

*Prof.ssa mostra delle immagini di vari tipi di calcoli, ndr.*

- I cristalli di ossalato sono fatti a croce, si trovano di frequente nelle urine e sono indifferenti al pH, cioè possono essere presenti nell'urina a qualsiasi pH. Sono strettamente correlati a malattie renali croniche, ma si possono trovare anche in caso di intossicazione da due sostanze:

- Etilenglicol (anticongelante che causa una grave alterazione del pH)

- Metossiflurano (anestetico)

- poi ci sono le malattie e le resezioni del piccolo intestino.

Possono trovarsi anche in alimenti vegetali, che subiscono un aumento quando c’è una forte introduzione di vitamina C.

- Cristalli di ammonio magnesiaco, a forma di bara, accompagnati da nuvole di muco. Questi cristalli si trovano solo in urine alcaline in cui l’ammoniaca precipita.
- Cristalli di urati fatti a stella di color giallo-marrone. Riflettono l’aumentato turnover delle nucleoproteine nelle innumerevoli chemioterapie che vengono fatte. Sono importanti nella nefropatia gottosa e sono tipici di urine acide.

**Proteinuria**

La proteinuria normalmente < 150 mg/L in 24 ore oppure 100-120 mg di proteine per grammo di creatinina.

In gravidanza la proteinia può aumentare fisiologicamente arrivando a un limite di 300 mg/l, cioè il doppio del normale. È consigliabile controllo costante per possibile sviluppo di ipertensione. Questi segni (proteinuria e aumento pressorio), infatti, sono caratteristici della sindrome preeclamptica.

La proteinuria glomerulare può arrivare anche a più di 4 g in 24 ore.

La proteina di Tamm-Horsfall viene secreta dall’ansa di Henle, dall’ansa ascendente del tubulo renale ed è importante perché è connessa con la formazione dei cilindri che poi vedremo.

Il metodo spettrofotometrico era basato sulla lettura della turbidimetria. È stato ormai sostituito dai metodi immunonefelometrici che sono molto più precisi e sicuri.

Le proteine urinarie:

- Albumina, circa 1/3 ed è filtrata dal glomerulo

- Tamm-Horsfall, secreta soprattutto a livello dell’ansa ascendente e all’inizio del tubulo distale. È importante perché è la matrice dei cilindri

- Proteine a basso peso molecolare (intorno ai 10000):

- alfa2-microgobulina,

- beta2-microglobulina, esprime un danno tubulare abbastanza grave

- Retinol binding protein,

- Catene leggere delle immunoglobuline k e l,
- Lisozima, riscontrato nella leucemia monocitica
- Emoglobina, si trova nell’emolisi
- Mioglobina, si trova nella rabdomiolisi
- Amilasi, si trova nell’epatite
- NAD, si trova nelle infezioni tubulari gravi

L’a2-macroglobulina non si trova nelle urine perché ha un peso molecolare troppo elevato ed ha varie funzioni tra cui quella di inibitore della fibrinolisi e della coagulazione.

Nella sindrome nefrosica si perdono molte proteine, quali albumina, IgG, IgA e IgM. Questa *(l’a2-macroglobulina,ndr)* non si perde, per cui spesso può essere preso per un picco come nel caso di mieloma, cioè bisogna stare attenti di non confondere la diagnosi differenziale tra “picchetto” del mieloma e questo picco dell’a2-macroglobulina che si alza nella sindrome nefrosica.

[DIAPOSITIVA con nomi delle varie proteine importanti, a basso peso molecolare]

Per misurare le proteine urinarie, a volte si preferisce usare il rapporto tra proteine urinarie e creatinina urinaria.

Rapporti per i bambini:

Sopra ai 2 anni di età, il rapporto deve essere inferiore a 0.2.

A 6 mesi-2anni, il limite superiore arriva a 0.5.

Un rapporto maggiore di 3 è sempre patologico.

Rapporti per gli adulti:

< 1 : normale

tra 1 e 2 : situazione incerta

> 2 : sicuramente patologica.

*Prof.ssa fa vedere delle immagini di sedimenti urinari, ndr*

L’emoglobina di solito non c’è nelle urine, si trova soltanto nelle:

- Alterazioni glomerulari,
- Malattie tubulo-interstiziali,
- Malattie post renali come i calcoli,
- Malattie neoplastiche delle vie urinarie e del rene.

L’emoglobinuria può essere rilevata in due modi:

1- Analisi microscopica (microscopio semplice o a contrasto di fase)

2- Metodo chimico basato sull’enzima perossidasi

In pediatria è molto importante riconoscere la provenienza degli eritrociti presenti nelle urine. Se i globuli rossi sono di provenienza glomerulare, l’ematuria sarà permanente, mentre se sono di provenienza bassa, possono essere legati infezioni urinarie e quindi l’ematuria scompare con il tempo.

Un altro metodo per vedere se c’è emoglobina nelle urine si basa sulla presenza dell’eme dell’emoglobina ad attività perossidasica. Il dip test (la striscia reagente) è impregnata di perossido in una miscela tampone e di un cromogeno che cambia colore quando si ossida.

Quindi abbiamo l’eme che è l’enzima che ha attività perossidasica, una sostanza ossidante che è $H_2O_2$ e un cromogeno, che è ossidabile e che quando si ossida cambia colore.

Alla fine della reazione il cromogeno è ossidato (ha un colore verde deciso) e l’$H_2O_2$ ridotta ad acqua.

Questo metodo è molto sicuro.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 9/5/2013 (1)

---

Lezione di Metodologia clinica & Medicina di Laboratorio, 09/05/13

Prof. Giancesare Guidi (Elisa Danese)

Sbobinatore: Elisa Schiavone

Revisore: Sofia Corradin

## FARMACOGENETICA

Il problema dei farmaci, è che sono visti dal nostro organismo come sostanze non facenti parte del nostro metabolismo, come *xenobiotici*, sostanze cioè che sono assorbite immediatamente e che poi vanno eliminate dall'organismo. Ma tra l'assunzione e l'eliminazione c'è il periodo che intercorre per la loro utilizzazione, per interferire con determinate fasi delle nostre vie metaboliche. Questa durata è condizionata dall'**individualità**: ciascuna persona reagisce in modo anche molto differente l'una dall'altra, non solo dal punto di vista degli aspetti biologici propri, ma anche dal punto di vista delle modalità in cui risponde alle sostanze estranee. Questa modalità di risposta, condiziona quindi la risposta al farmaco, tanto che, per alcuni farmaci, si osservano effetti che anche a parità di dose sono enormemente differenti. Questo aspetto è importanti per molte categorie di farmaci (ad esempio anticoagulanti, farmaci che hanno un'azione antibiotica o antimicotica e farmaci implicati nel trattamento delle neoplasie).

L'attenzione dei laboratori si è quindi diretta alle modalità con cui si realizza questa differente risposta, legata alle caratteristiche individuali e genetiche. Ciascuno ha un assetto genetico che lo fa rispondere in maniera diversa rispetto all'altro. Queste differenze, nella grande maggioranza degli individui possono essere di piccolo conto, ma ci sono anche dei gruppi di soggetti che poi nei grandi numeri diventano importanti, che rispondono in maniera o esagerata o che non rispondono (al farmaco, NdR). Questo è il motivo per cui alle volte si osservano delle grandi differenze nella risposta a determinati farmaci, soprattutto a farmaci che sono molto utilizzati in terapie oncologiche.

Di questo vi parlerà oggi la dott.ssa Elisa Danese, nostra ricercatrice che da tempo si occupa di aspetti di farmacogenetica, sia applicati alle terapie che interferiscono con l'emostasi, sia ai trattamenti per le varie forme di neoplasie. (*Il professore lascia la parola alla dott.ssa*, NdR)

Cominceremo con dei concetti generali riguardanti le reazioni avverse ai farmaci, con le definizioni di farmacogenetica e del concetto più ampio di farmacogenomica e poi vedremo degli esempi di applicazioni sia nel campo della ricerca che della pratica clinica.

Quando viene somministrato un farmaco a un paziente, quello che ci si aspetta è di ricevere una risposta adeguata alla dose terapeutica, che quindi il paziente sia nel cosiddetto **range terapeutico**. Questo non sempre succede, in quanto ci sono dei pazienti che, a parità di dose, presentano una risposta ridotta, e altri che invece possono presentare una risposta eccessiva. Quando questi due eventi sono amplificati, si può avere il **fallimento terapeutico** da una parte, e la **tossicità** al farmaco, quindi le reazioni avverse, dall'altra.

Nel 2003, Allen Roses, il vicepresidente della sezione di genetica della GlaxoSmithKlain, fece questa dichiarazione sulla BBC, secondo cui era stato osservato che più del 90% dei farmaci allora in commercio funzionavano solo nel 30-50% delle persone cui venivano somministrati. In realtà, questa variabilità nella risposta ai farmaci non interessa sempre tutte le categorie degli stessi ad oggi in commercio, si riscontra difatti una variabilità più o meno ampia secondo le classi di farmaci che andiamo a considerare. In particolare, si osserva un'efficacia ridotta di circa il 60% per i farmaci anti-ipertensivi, per gli antidepressivi abbiamo un'efficacia inferiore nel 50% dei casi, e nel 90% per gli antipsicotici.

Per quanto riguarda la tossicità, è stato osservato nel '94 che circa due milioni di pazienti ospedalizzati negli USA avevano avuto reazioni avverse gravi di cui circa 100000 fatali. Quindi le reazioni avverse ai farmaci venivano classificate come la quarta o sesta causa di morte più comune in pazienti ospedalizzati, davanti anche a polmonite e diabete.

Ma quali sono i fattori che possono contribuire alla variabilità individuale nella risposta ai farmaci?

Esistono fattori fisiologici ben noti come l'età, il sesso, la condizione fisica, il peso corporeo, lo stile di vita e anche l'etnia. Bisogna considerare anche i fattori patologici, come la presenza di co-morbidità o il livello di funzionalità epatica e renale. Ci sono poi fattori ambientali, come lo stato nutrizionale, il consumo di alcol, il fumo e l'interazione tra farmaci; infine, nel ventesimo secolo, si è visto che fattori genetici (come i **polimorfismi**) possono contribuire in maniera sostanziale a questa variabilità.

Quando si parla di variabilità genetica, e quindi del cambiamento della normale sequenza nucleotidica, si parla sempre di due grandi categorie: la categoria delle *mutazioni*, le quali presentano una frequenza nella popolazione generale inferiore all'1%, causano generalmente modifiche fenotipiche rilevanti e quindi sono generalmente associate a malattie mendeliane, ci sono poi invece *polimorfismi*, che per definizione hanno una frequenza nella popolazione generale maggiore dell'1%, comportano piccole variazioni fenotipiche, generalmente mediano con i fattori ambientali, e rappresentano quindi fattori di suscettibilità per l'insorgenza di certe patologie oppure per determinare la variabilità nella risposta ai farmaci.

Esistono molti tipi di polimorfismo: i più rappresentati dal punto di vista numerico sono gli **SNP**, polimorfismi a singolo nucleotide. Esistono poi polimorfismi d'inserzione e delezione, e delle variazioni nel numero di ripetizione – possono essere di lunghezza molto elevata, fino a qualche centinaio di basi, oppure possono coinvolgere piccole porzioni del genoma di 2-4 nucleotidi (Short Tandem Repeat). La maggior parte dei polimorfismi può essere poi suddivisa in altre due categorie, a seconda della posizione in cui si trovano all'interno del genoma. In particolare, i polimorfismi si possono trovare nelle regioni codificanti del genoma, in questo caso si divideranno in polimorfismi missenso, senso o non senso. I primi, risultano dalla sostituzione amminoacidica, i secondi non alterano la codifica dell'amminoacido, infine i non senso portano alla formazione di un codone di stop, che segna il blocco della traduzione della proteina corrispondente e quindi la proteina sarà troncata; tanto maggiore sarà il pezzo di proteina non trascritta, tanto sarà sfavorevole questa mutazione. Riguardo invece ai polimorfismi che si possono trovare nelle regioni non codificanti, queste possono rientrare: all'interno delle regioni introniche, all'interno delle regioni intergeniche (tra un gene e l'altro), all'interno delle regioni non trascritte in 3' e 5' (NTR in 5' sono tra la fine del sito d'inizio di trascrizione e l'inizio del primo codone; NTR in 3' sono alla fine di tutti i codoni) od infine all'interno della regione promotore. Poiché il 95% del nostro genoma è intergenico, è molto probabile che la maggior parte dei polimorfismi non causi alterazioni nella trascrizione delle proteine, tuttavia questi polimorfismi possono avere delle conseguenze nella struttura terziaria del DNA e possono quindi alterare la replicazione dello stesso, e anche lo splicing.

Dal progetto genoma sappiamo che oltre il 99% del genoma è comune a tutti gli individui. Quindi, le variazioni fenotipiche tra un individuo e un altro risiedono nel restante 1%, che corrisponde circa ad una differenza di tremila nucleotidi - questo è il numero che ci differenzia fenotipicamente l'uno dall'altro. Le differenze non sono solo nell'aspetto fenotipico, ma riguardano anche la variabilità nella risposta ai farmaci. Sembra che questa variabilità genetica possa influire, a seconda del farmaco, dal 20% fino al 95% nel determinare una differenza interindividuale, che si può riscontrare dopo l'assunzione del farmaco.

A seguito quindi del progetto genoma e di tutte queste scoperte innovative, era stato ipotizzato nel 2003 che potesse essere possibile identificare a priori i pazienti suscettibili di risposta al farmaco e quelli invece che molto probabilmente avrebbero una risposta avversa o nessun effetto a seguito della somministrazione dello stesso.

In pratica, lo scopo della **farmacogenetica** sarebbe quello di individuare, all'interno di un gruppo di pazienti affetti dalla stessa patologia, quali sono i pazienti che hanno una buona probabilità di rispondere positivamente al farmaco di elezione per quella patologia; allo stesso tempo, identificare quei pazienti che mostrerebbero delle risposte poco efficaci a seguito di somministrazione del farmaco stesso, per i quali, quindi, sarebbe opportuno o aumentare le dosi del farmaco o cambiare tipo di trattamento. Inoltre, la farmacogenetica consente di individuare quei pazienti che potrebbero mostrare effetti tossici a seguito della somministrazione dello stesso farmaco.

La scoperta dei polimorfismi implicati nella farmacogenetica si può dividere in due parti secondo l'era: nell'*era pregenomica* (prima del 2000), una volta osservata un'imponente reazione avversa al farmaco in un paziente, si andava a studiare la famiglia del paziente alla ricerca di un fenotipo in comune tra gli individui della famiglia stessa, dopodiché si facevano studi genetici in cui si andava a vedere qual era il gene coinvolto in questo fenotipo e si facevano quindi delle correlazioni genotipo-fenotipo. In particolare, si confrontavano diversi fenotipi genetici all'interno di uno stesso gruppo fenotipico. Nell'*era post genomica* (dopo il 2000), invece, con lo sviluppo di tecniche avanzate come il sequenziamento, gli RCGH, la real time ecc., si parte da un presupposto diverso, cioè si genotipizza il genoma di molti individui e si va a vedere se il polimorfismo che presenta una frequenza elevata nella popolazione sia più rappresentato in alcuni gruppi fenotipici (es pazienti affetti da ipertensione, pazienti affetti da infarto del miocardio, neoplasie ecc.).

**Definizioni di farmaco genetica e farmacogenomica**

1. FARMACOGENETICA: scienza che studia un numero definito di geni noti e la correlazione tra una determinata molecola (farmaco) in un dato gene – scienza che studia le differenze individuali nella risposta ai farmaci, specialmente i polimorfismi genetici che modificano il metabolismo (nell'ambito quindi della farmacocinetica) e le risposte ai farmaci (nell'ambito quindi della farmacodinamica) – studio di un singolo gene o di un piccolo numero di geni che si associano a un effetto fenotipico rilevante.
2. FARMACOGENOMICA: studio della correlazione tra una molecola e l'intero genoma – disciplina emergente derivata dalla farmacogenetica che ha lo scopo di applicare le nuove scienze sul genoma allo sviluppo d nuovi farmaci e all'individuazione delle terapie – si studia l'intero genoma e le correlazioni con piccoli effetti fenotipici o multipli.

La farmacogenetica interessa lo studio dei polimorfismi che interessano la farmacocinetica e la farmacodinamica. Da una parte quindi gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci oppure nel loro trasporto, dall'altra parte invece i polimorfismi nei geni implicati nel recettore del farmaco stesso.

Bisogna tener presente che i tratti farmacogenetici molto raramente sono monogenici, molto più frequentemente si tratta di tratti poligenici. Bisogna comunque sempre considerare che la variabilità ai farmaci è sempre multifattoriale, che quindi i fattori clinici e patologici devono essere sempre tenuti in considerazione.

In questa slide (9), si vede un esempio di polimorfismo che coinvolge un enzima che metabolizza il farmaco (in alto); nella parte più in basso invece, si vede l'effetto del polimorfismo di un gene che codifica per il recettore. In alto farmacocinetica, in basso farmacodinamica. Si vede che a seconda

che i pazienti siano wild-type omozigoti o eterozigoti per questo dato polimorfismo oppure omozigoti mutati per il polimorfismo abbiamo delle aree sotto la curva di concentrazione del farmaco completamente diverse: andiamo da 100 AUC nel wild type a 200 per gli eterozigoti fino a 400 per gli omozigoti mutati. Dall'altra parte, un altro polimorfismo di un recettore potrebbe essere che i pazienti wild type abbiano un'efficacia terapeutica dell'85%, gli eterozigoti ridotta pari a circa il 50% e gli omozigoti mutati hanno invece un'efficacia ridottissima pari a circa il 10%.

Dalla combinazione di queste possibili varianti possiamo avere nuove tipologie di risposta a seguito della somministrazione del farmaco. Suddividendo nelle tre classi principali sulla base del genotipo del gene che codifica per l'enzima che metabolizza il farmaco avremo in alto bassa tossicità, nel mezzo una tossicità moderata e in basso, negli omozigoti mutati un'alta tossicità. E all'interno di ogni gruppo, a seconda del genotipo presente guardando l'aspetto farmacodinamico avremo delle scale di efficacia diversa: passiamo da un 65% di efficacia fino a un 9% nel primo gruppo e così via.

Quando si parla di farmacocinetica si parla comunemente di metabolismo del farmaco ma senza dimenticarsi che le fasi della farmacocinetica sono quattro.

1. Assorbimento
2. Distribuzione
3. Metabolismo
4. Eliminazione

In questa slide si possono vedere i processi implicati nella farmacocinetica in blu, con le fasi della biodisponibilità dopo distribuzione orale in blu scuro, dall'altra parte in verde i vari passaggi della farmacodinamica con gli step in verde scuro che riguardano l'efficacia clinica. Quindi, dopo somministrazione orale di un farmaco avremo per prima cosa la dissoluzione dello stesso, l'assorbimento passivo e attivo a livello gastrointestinale, metabolismo epatico, poi il farmaco entra in circolo, può essere escreto o legarsi a proteine plasmatiche e distribuirsi poi in maniera attiva o passiva all'interno dei tessuti. Da qui poi passa in concentrazioni attive nel compartimento d'interesse e qui può agire con il suo target terapeutico (può agire anche con dei target secondari e quindi causare effetti collaterali e tossicità).

Sempre per quanto riguarda la farmacocinetica, i polimorfismi d'interesse possono riguardare geni che codificano per enzimi coinvolti nell'assorbimento, nella distribuzione e nell'eliminazione del farmaco, ma molto più frequentemente questi polimorfismi codificano per enzimi che metabolizzano il farmaco stesso (lo attivano o inattivano). In particolare questa categoria di enzimi si suddivide a sua volta in due classi: gli **enzimi di fase 1 e di fase 2** – i primi catalizzano reazioni di ossidoriduzione, riduzione, idrossilazione e dealchilazione, hanno lo scopo principale di introdurre dei gruppi funzionali per attivare inattivare il farmaco, generalmente in questa fase lo xenobiotico è reso più polare, in quanto le caratteristiche lipofile consentono al farmaco di raggiungere il compartimento target passando le diverse membrane, e diventa poi uno svantaggio nel momento in cui il farmaco deve essere eliminato, quindi l'organismo cerca di rendere questi composti estranei più polari così che possano essere più facilmente eliminabili. Gli enzimi di fase 2 completano i processi iniziati dagli enzimi di fase 1 e comprendono reazioni di coniugazione generalmente con acido glucuronico ma anche glutatione, acetato o solfato, anche in questo caso lo scopo è di inserire dei gruppi polari per facilitare l'eliminazione del farmaco con la bile oppure aumentare la solubilità in acqua per facilitare l'eliminazione renale.

Le reazioni di fase 1 sono catalizzate dalla famiglia dei citocromi P450: questi sono molto attivi in vari distretti del nostro organismo, si trovano soprattutto nel REL del fegato. Attivano farmaci,

detossificano sostanze, e trasformano sostanze non tossiche in sostanze tossiche. Molti di questi enzimi sono polimorfici, e per questo sono di grande interesse nel campo della farmacogenetica. In particolare, i polimorfismi dei CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 hanno una rilevanza clinica molto importante.

Attualmente esistono più di 7700 sequenze identificate come citocromi negli organismi superiori; nell'uomo ci sono 18 gruppi di geni e 44 sottofamiglie. Fino ad oggi sono stati identificati 57 geni CYT funzionali più 58 pseudogeni, organizzati in tre principali cluster, più singoli geni sparsi sui vari cromosomi. I substrati endogeni di questi cromosomi includono acidi grassi, eicosanoidi, steroidi, acidi biliari, vitamina D, retinoidi e uroporfinogeni.

Le famiglie dei citocromi (cluster 1,2,3) sono responsabili della grande maggioranza del metabolismo di fase 1 cioè del metabolismo ossidativo e interessano oltre l'80% dei farmaci attualmente utilizzati nella pratica clinica.

Qui si vede una rappresentazione schematica della distribuzione di questi citocromi sulla base della loro importanza nel metabolismo dei farmaci ad oggi in commercio. Come vedete una grandissima percentuale di farmaci viene metabolizzata dal citocromo P3A4, 5 o 7.Un'altra porzione molto rilevante viene metabolizzata dal CYP2D6. Abbiamo poi percentuali minori per il 2C9 e il 2C19. Per quanto riguarda la nomenclatura di questi citocromi dovete ricordarvi che CYP è un'abbreviazione per citocromo P450, il primo numero che segue questa sigla rappresenta la famiglia, e tutti i CYP appartenenti a una famiglia presentano oltre il 40% di omologia di sequenza. La lettera successiva rappresenta la sottofamiglia e quindi riunisce CYP con oltre il 55% di omologia. Il numero successivo è il gene specifico e quindi il corrispondente enzima. In * 1 * 2 * 3 s'identifica l'allele specifico. È una convinzione internazionale identificare con *1 sempre l'allele wild type e con i numeri successivi le varianti.

Quando si parla di farmacogenetica bisogna tenere presente che non sempre tutti i polimorfismi hanno delle frequenze comparabili in popolazioni diverse e che quindi lo studio della farmacogenetica per alcuni farmaci può essere molto rilevante clinicamente in alcune etnie e invece quasi del tutto irrilevante in alcune popolazioni; questo perché le frequenze sono diverse. Come vedete per esempio i polimorfismi del CYP2D6 che hanno un a frequenza del 6,8% nelle popolazioni svedesi hanno una di 1% in Cina. Considerando invece il 2C19 abbiamo la frequenza pari al 2,7% negli americani bianchi, passiamo al 3,3% negli svedesi, 14% nelle popolazioni cinesi fino al 18% nei giapponesi.

Riguardo agli enzimi di fase 2 si tratta per lo più di reazioni di coniugazione; la più frequente è la glucuronizzazione (la coniugazione con acido glucuronico). Si hanno però altri tipi di coniugazione: col solfato, glutatione, metilazioni, acetilazioni e ossidazione. Gli addetti alla glucuronazioni rappresentano la percentuale più alta di questi enzimi. Come per gli enzimi di fase 1 bisogna sempre tenere presente la diversa distribuzione delle frequenze nelle varianti alleliche nelle diverse popolazioni.

Vediamo quindi tre farmaci di cui vi presenterò le caratteristiche di farmacogenetica, due dei quali, il Warfarin e Clopidogrel rientrano ancora in fase di ricerca. Per quanto riguarda invece il trattamento per l'epatite C siamo invece già ad un aspetto più avanzato in quanto si parla di farmacogenetica applicata alla pratica clinica.

Il Warfarin appartiene alla classe dei dicumarolici, è stato scoperto nel 1933 come prodotto di fermentazione del trifoglio. Possiede un carbonio chirale in posizione 3 della catena laterale, questo fa sì che esistano due enantiomeri dello stesso farmaco di cui il levogiro è più attivo del destrogiro.

Il primo utilizzo di questo composto è stato approvato nel 1948 e veniva impiegato come potente ratticida. Questo perché la prima osservazione fatta nel 1933 veniva dall'osservazione, fatta nel Wisconsin, in cui si era osservata una morìa di ovini che avevano appunto ingerito del foraggio fermentato. E in questo foraggio fermentato era stato trovato questo composto. Poi utilizzato come potente ratticida. Nel 1954 viene approvato l'utilizzo del Warfarin nell'uomo e la prima somministrazione in un personaggio famoso avviene nel 1955 quando viene somministrato al presidente Eisenhower in seguito ad infarto miocardico. Infine i primi trial clinici si hanno nel 1960 e da qui in poi saranno sempre maggiori riguardando le diverse indicazioni. Siamo partiti con la fibrillazione atriale ma come vedremo le indicazioni sono molteplici.

Dal 1954, anno in cui il Warfarin è approvato per l'utilizzo nell'uomo fino agli anni 2010, in cui abbiamo l'approvazione di nuovi farmaci somministrati per via orale, il Warfarin è stato farmaco d'elezione per oltre cinquant'anni. Oggi, nonostante i nuovi farmaci, viene comunque utilizzato moltissimo.

Le principali indicazioni alla terapia anticoagulante con Warfarin sono la fibrillazione atriale, altre cardiopatie come protesi valvolari e miocardiopatia, un'altra frequente indicazione è la trombosi venosa profonda e l'embolia polmonare. In alcuni casi viene usato anche a seguito di infarto del miocardio.

Quali sono i principali problemi della terapia con Warfarin?

Il fatto che presenta un'altissima variabilità interindividuale in termini di efficacia e di tossicità a parità di dose somministrata. Questo dipende anche dal fatto che il range terapeutico è molto ristretto. Nella maggior parte delle indicazioni che vi ho illustrato ci si aspetta dopo somministrazione del farmaco che il paziente rientri in un range terapeutico definito con un'INR compreso fra 2 e 3. Valori di INR inferiori espongono i pazienti a eventi tromboembolici, valori superiori a eventi emorragici. Il monitoraggio di questo farmaco deve essere molto stringente.

Vediamo qui come agisce il Warfarin. È un antagonista della vitamina K. Inibisce la vitamina K-epossidoriduttasi. Questo enzima catalizza l'attivazione della vitamina K dalla forma ossidata alla forma ridotta la quale a sua volta è un cofattore fondamentale per la gamma carbossilasi la quale permette l'attivazione dei fattori della coagulazione.

In questa diapositiva si vede meglio. Questo enzima catalizza la reazione dalla forma 2,3 epossidica alla forma attiva idrochinonica. Questa forma attiva agisce poi da cofattore per la gamma-glutammil carbossilasi la quale aggiunge un residuo carbossilico ai residui di acido glutammico formando dei residui gamma-carbossiglutammici in alcuni fattori della coagulazione – quelli vitamina K-dipendenti, quindi (qui indicati con quadratini azzurri) i fattori XI, XII, IX, X, II e VII.

E' stato dimostrato che dosi terapeutiche di Warfarin diminuiscono la quantità totale di forme attive di fattori della coagulazione del 30-50% cioè: questi fattori vengono comunque sintetizzati dal fegato, ma non sono più attivi.

In questa slide vengono rappresentati i polimorfismi di maggiore interesse per quanto riguarda l'aspetto farmacogenetico del Warfarin. Esistono due polimorfismi ipofunzionali delle CYP2C9 che è il citocromo deputato all'inattivazione del farmaco, cioè trasforma il farmaco dalla sua forma attiva alla forma idrossilata che è inattiva. Quando questo citocromo è ipofunzionale, sono necessarie minori dosi di farmaco per raggiungere lo stesso effetto terapeutico perché il farmaco viene inattivato più lentamente. Allo stesso modo, esiste un polimorfismo più noto della vitamina K-epossido reduttasi che fa sì che questo enzima sia anche in questo caso ipofunzionale, e che

quindi converta la vitamina K nella forma attiva in maniera meno efficace. Anche in questo caso quindi, i portatori di questa variante allelica avranno bisogno di dosi di Warfarin inferiori rispetto al range terapeutico, perché ci sono quantità inferiori di vitamina K disponibile.

Nella pratica clinica, il monitoraggio della terapia anticoagulante orale in genere avviene così: si prescrive ai pazienti una dose standard iniziale pari a circa 5mg/giorno dopodiché si monitora in maniera continua l'INR. In questo caso possiamo quindi avere due classi di pazienti: quelli che hanno un INR nell'intervallo 2-3, che quindi rientrano nel range terapeutico, per i quali sarà consigliato di continuare la terapia con gli stessi dosaggi e saranno richiesti monitoraggi a tempi più dilatati (dalle 3 alle 5 settimane) e pazienti che cadranno al di fuori del range terapeutico di INR, che avranno invece bisogno di un aggiustamento delle dosi di Warfarin fino a riportare l'INR al range terapeutico. Ovviamente in questi casi i pazienti sono seguiti in maniera più stringente e il monitoraggio dell'INR viene fatto molto più frequentemente.

E' stato osservato che nei primi trenta giorni di trattamento con Warfarin si va incontro frequentemente ad eventi avversi, a causa del fatto che il farmaco presenta uno stretto intervallo terapeutico ed un'elevata variabilità interindividuale.

L'1/3 degli INR dei pazienti in trattamento è al di fuori del range terapeutico; inoltre, l'INR che non è compreso nell'intervallo tra 2 e 3 porta ad un aumentato rischio di over coagulazione o di sanguinamento. Negli USA è stato osservato che fenomeni di sanguinamento occorrono dal 6 al 39% dei pazienti in trattamento e che più del 6% dei pazienti va incontro ad episodi emorragici, a volte anche fatali, durante il trattamento.

Gli aspetti di farmacogenetica di cui vi parlo in questa sede riguardano il metabolismo dell'enantiomero levogiro del farmaco, perché questa forma di farmaco è molto più attiva dell'enantiomero destrogiro e questa differenza è pari a circa 25 volte. Però se uno dovesse andare a considerare tutti i geni implicati nel metabolismo di questo farmaco, sarebbero molto numerosi. Ci concentriamo dunque sul CYP2C9, responsabile del metabolismo di oltre il 16% dei farmaci attualmente in commercio; le mutazioni in questo gene si riscontrano in circa il 40% dei caucasici. Per quanto riguarda la terapia con Warfarin i genotipi di maggiore interesse sono le varianti alleliche *2 e *3. Questo perché si riscontrano con una frequenza piuttosto elevata, gli eterozigoti per queste varianti alleliche nella popolazione sono circa il 10-16%, gli omozigoti mutati in queste due varianti raggiungono circa il 4%.

A seconda del genotipo del 2C9 i pazienti in terapia si possono suddividere in metabolizzatori normali, quelli che sono wild-type per quel genotipo, metabolizzatori intermedi che sono gli eterozigoti, e metabolizzatori lenti che sono gli omozigoti *2*2 o che hanno una doppia eterozigosi *2*3.

A seconda degli studi si possono avere delle classificazioni diverse: infatti, si vede che in questa tabella rispetto alla prima gli eterozigoti *2*3 rientrano nei metabolizzatori lenti (non intermedi). Comunque l'effetto di questa variante è quello di avere un metabolismo ridotto.

Quindi, nel caso dei polimorfismi di cui vi ho parlato, siamo nell'ambito di polimorfismi che causano una diminuzione dell'attività enzimatica, in questo caso quindi il farmaco viene eliminato più lentamente e quindi sarà sufficiente una dose minore per raggiungere l'efficacia terapeutica, siamo quindi nell'ambito della farmacosensibilità.

Questi polimorfismi di cui ho parlato, si associano non solo alla dose di mantenimento di Warfarin, ma anche al tempo che impiega il paziente a raggiungere la dose stabile, cioè ad entrare nel range

terapeutico; si associano anche alla percentuale di misurazione di INR fuori range e agli eventi emorragici.

La variabilità nella dose di mantenimento del farmaco somministrata per avere un'efficacia terapeutica a parità di genotipo è comunque molto ampia. Questo perché non ci sono solo fattori genetici da tenere in considerazione, ma anche altri fattori. In particolare, i PMI: all'aumentare del PMI del paziente aumenta anche la dose di Warfarin. Per quanto riguarda i gruppi etnici, si osserva che gli afroamericani devono ricevere generalmente una dose di Warfarin del 13% superiore rispetto ai caucasici per avere lo stesso effetto terapeutico. Dosi inferiori sono invece richieste per gli asiatici. All'aumentare dell'età la dose di Warfarin va invece diminuita, così come nel sesso femminile, e nei pazienti che utilizzano contemporaneamente l'Amiodarone.

L'importanza della farmacogenetica per questo farmaco è stata ampiamente documentata in letteratura, ci sono numerosissimi trials clinici tanto che nel 2007 l'FDA aveva corretto i foglietti illustrativi di questo farmaco indicando la possibilità di eseguire test genetici per definire in maniera più precisa la dose di farmaco più adatta a ciascun paziente. L'FDA raccomandava la genotipizzazione solo di questi due polimorfismi, lo *2 e lo *3, perché avevano dimostrato il maggiore impatto clinico, rispetto a tutti gli altri studiati.

Passano alla farmacogenetica del Warfarin dal punto di vista farmacodinamico, il VKORC1, anche in questo caso il polimorfismo più noto si associa ad una diminuzione dell'attività enzimatica del VKORC1 si ha quindi una diminuita disponibilità della vitamina K e un minor numero di fattori della coagulazione attivi, in questo caso in pazienti che hanno questo polimorfismo è sufficiente una dose minore di farmaco per promuovere l'effetto anticoagulante.

E qui vedete l'effetto di questo polimorfismo sulla dose di mantenimento di farmaco somministrata ai pazienti che rientrano nel range terapeutico man mano che si passa da wild type ad eterozigote al mutato, le dosi di warfarin sono sempre inferiori. Quindi qui ancora una volta la classificazione come metabolizzatori estensivi, intermedi o lenti a seconda della suddivisione del CYP2C9, dall'altra parte la suddivisione dei pazienti in normali, eterozigoti o omozigoti e quindi della predizione enzimatica bassa, media o alta a seconda del VKORC1 e qui vedete la combinazione di entrambi. (?) Il genotipo del VKORC1 influisce in una percentuale superiore rispetto al CYP2C9 nel determinare la variabilità di risposta al Warfarin. Quindi il genotipo Bcorc spiega circa il 23% della variabilità di risposta al Warfarin, il CYP2C9 spiega circa il 17%. Ovviamente percentuali diverse si avranno seconda dei vari studi considerati. Quindi dopo la scoperta di questo ulteriore enzima implicato nell'aspetto farmaco dinamico del Warfarin, l'FDA nel 2010 ha nuovamente modificato il foglietto informativo del Warfarin aggiungendo come indicazione anche la genotipizzazione per questo gene. L'effetto è molto importante secondo questa tabella suggerita dall'FDA, passiamo dai pazienti wild type per entrambi i genotipi (questi pazienti riceveranno dosi da circa 5-7 mg die per essere nel range terapeutico) ai pazienti omozigoti mutati sia per un polimorfismo che per l'altro (che riceveranno dosi notevolmente inferiori; pari a 0,5-2 mg die, per raggiungere lo stesso effetto terapeutico). In seguito alla scoperta di questi due genotipi sono stati pubblicati in letteratura numerosissimi articoli nei quali gli autori cercavano di definire quale fosse l'algoritmo farmacogenetico più predittivo della dose di farmaco da somministrare ad ogni singolo pazienti. Attualmente l'algoritmo che sembra funzionare meglio è quello proposto da Gage nel 2008, il quale considerava nel calcolo della dose di farmaco da dare a ciascun paziente il genotipo CYP2C9 *2*3 , il genotipo VKORC1, ma anche il BSA, l'età, INR target, l'utilizzo dell'Amiodarone, l'abitudine al fumo, la razza afroamericana e l'indicazione per tromboembolismo venoso per il farmaco. In questo articolo gli autori dichiaravano che il loro algoritmo farmacogenetico era in grado di spiegare circa il 54% della variabilità di risposta al Warfarin a

fronte di un 22% degli algoritmi cosiddetti clinici, cioè quelli che includono solo fattori clinici e non genetici.

Questo è solo per farvi capire come vengono costruiti nella pratica questi algoritmi. Si fanno delle regressioni multiple in cui ogni fattore che viene considerato sarà associato ad un coefficiente beta che è di una certa significatività. Ogni autore inserisce negli algoritmi solo i fattori sia clinici che genetici che sono significativamente rilevanti e che quindi hanno un effetto sulla variabilità di farmaco. E poi i valori beta che si ricavano da queste regressioni multiple si inseriscono in queste formule. Infine una scoperta di questi ultimi anni è che un ulteriore citocromo, CYP4F2, che codifica per un citocromo che inattiva la forma idrochinonica della vitamina K possa avere anche questo una certa rilevanza dal punto di vista farmacogenetico. Il polimorfismo d'interesse per quanto riguarda questo gene è uno solo 1347CT, e nel nostro laboratorio abbiamo condotto uno studio in cui il polimorfismo di questo gene contribuisce a spiegare la variabilità di risposta al farmaco per circa il 9,3%. Sicuramente un effetto inferiore rispetto a quanto viene predetto da Vcorc e dal CYP2C9 ma comunque un effetto che deve essere tenuto in considerazione per migliorare la predittività di risposta. Il Warfarin quindi, concludendo, si presenta come un farmaco ideale e per l'approccio farmacogenetico e questo perché è usato molto comunemente, presenta altissima variabilità interindividuale, la sua amministrazione è complicata dal continuo monitoraggio che richiede, ha una finestra terapeutica molto ristretta, e le varianti genetiche spiegano una grandissima proporzione della variabilità osservata. Quindi questo è un caso in cui si può dire che la farmacogenetica sembra avere un impatto clinico importante, anche se ricordo che siamo ancora in fase di ricerca. Non siamo ancora arrivati all'applicazione nella pratica clinica.

Sembrava negli ultimi anni che lo sviluppo di nuovi farmaci, quali il Dabigatran e il Rivaroxaban, potesse in qualche modo rivoluzionare la terapia anticoagulante orale. Il primo è un inibitore diretto della trombina. Il secondo è un inibitore del fattore Xa; perchè sembrava che potessero rivoluzionarla? Perché come vedete nel box in basso l'assunzione dei farmaci non dovrebbe richiedere monitoraggio costante dell'INR. Questo pone il vantaggio per il pz che non deve presentarsi mensilmente, o più frequentemente, in ospedale per il monitoraggio. Dall'altra parte è anche stato osservato che sebbene CYT 2C9 non sia coinvolto nel metabolismo di questi farmaci ci sono però degli altri enzimi e quindi degli altri polimorfismi coinvolti che ne possono determinare la variabilità interindividuale. Solo per farvi un esempio riguardo al Dabigatran, è stato osservato che esistono dei polimorfismi associati a due enzimi (la carbossilesterasi 1 e la BCP1, che un gene che codifica per la P-glicoproteina) che possono avere una rilevanza per quanto riguarda la farmacocinetica del Dabigatran. In particolare il primo, la carbossilesterasi1, è responsabile della biotrasformazione del Dabigatran-ixilato, che è la forma somministrata, nel metabolita attivo, il Dabigatran.

Lo SNP che ha un effetto più forte è associato ad un 15% di diminuzione della concentrazione plasmatica del farmaco per ogni allele. Dall'altra parte il gene ABCP1, che codifica per la glicoproteina P, può avere anch'esso un effetto importante. Questo enzima infatti rappresenta una pompa ATP-dipendente per gli xenobiotici. Dabigatran-ixilato è substrato di questo enzima. Gli inibitori dell'enzima stesso come l'Amiodarone aumentano quindi la biodisponibilità del Dabigatran dal 10-20%. Inoltre polimorfismi di questo genere sono associati ad un aumento del 12% della concentrazione plasmatica del farmaco. Questo solo per dire che anche se ci sono dei nuovi farmaci oggi in commercio che ad un primo avviso sembrerebbero non avere problemi di grossa variabilità interindividuale, problemi di farmacogenetica etc., quando gli studi di letteratura poi aumentano si va a scoprire in effetti che poi anche questi farmaci di nuova generazione sono in realtà affetti dalla problematica della farmacogenetica.

Passiamo ora al Clopidogrel. È di interesse mondiale per quanto riguarda la farmacogenetica. Perché dopo le Statine rappresenta il secondo farmaco più venduto al mondo. La doppia terapia antiaggregante piastrinica con un farmaco tienopiridinico e l'Aspirina rappresenta lo standard di cura per i pz con sindrome coronarica acuta e/o sottoposti ad intervento di rivascolarizzazione coronarica percutanea. Delle tienopiridine ne esistono ad oggi tre composti tra cui è il Clopidogrel che ha superato ampiamente l'utilizzo della Ticlopidina in virtù dei suoi minori effetti collaterali. Nel 2009 è poi stato approvato l'utilizzo del Prasugrel. Tutte queste tienopiridine sono dei profarmaci i cui metaboliti attivi agiscono inibendo in maniera irreversibile il recettore per l'ATP mediante la formazione di un ponte disolfuro con un residuo cisteinico appunto del recettore dell'ATP che è il P2Y12 . In questo modo questi farmaci bloccano la cascata di trasduzione del segnale promossa fisiologicamente dell'ATP, la quale normalmente comporta l'aggregazione piastrinica, la stabilizzazione degli aggregati indotti da altri agonisti, la stimolazione di rilascio di agonisti dai granuli densi e l'inibizione alla prostaciclina. Tutti questi processi sono bloccati dall'utilizzo del Clopidogrel. Ma quali sono i problemi legati alla somministrazione di questo farmaco? Sicuramente il rischio di sanguinamento. Altro problema importante, e legato al primo, è il fatto che il legame a questo recettore è irreversibile. Inoltre l'azione del Clopidogrel si manifesta dopo alcuni giorni di terapia, quindi ha un lento inizio di azione. Poi come nel caso del Warfarin, presenta altissima variabilità interindividuale di risposta. Almeno due di questi quattro problemi che vi ho presentato sono dovuti l metabolismo del Clopidogrel stesso. Questo farmaco viene metabolizzato per oltre l'85% da esterasi plasmatiche che lo trasformano in farmaco inattivo. Quindi solo il 15% del farmaco è reso biodisponibile per i processi di metabolismo epatico chelo trasformano nel metabolita attivo. Questo metabolismo epatico coinvolge in maniera preponderante il citocromo P2C19. È stato osservato che i pazienti portatori di varianti alleliche di questo citocromo hanno un'attività piastrinica residua dopo somministrazione del farmaco. Questo risulta clinicamente rilevante nel momento in cui i pazienti che hanno attività residua piastrinica sono più esposti al cosiddetto fallimento terapeutico e a quindi a rischio di morte per cause cardiovascolari come infarto miocardico e ictus.

Le varianti del CYP2C19 clinicamente rilevanti ad oggi sono numerosissime, esistono dei polimorfismi come lo *17 che sono iperfunzionali per il CYP2C19, altri invece portano ad una funzionalità dell'enzima diminuita di molto o di poco. A seconda dei genotipi avremo la suddivisione dei pazienti in metabolizzatori ultra-rapidi (e saranno appunto i portatori di *17), avremo poi i metobolizzatori normali od estensivi (wild type), avremo poi i metabolizzatori intermedi (eterozigoti per lo *2 e lo *3) e poi dei metabolizzatori molto lenti (omozigoti od eterozigoti combinati per queste varianti alleliche). Da un punto di vista della farmacocinetica cosa comporta essere portatore di una variante associata ad ipofunzionalità? Che avremo una riduzione di circa il 32% della concentrazione plasmatica del farmaco attivo. E questo, in cosa si traduce in termini di farmacodinamica? In una riduzione del 25% della risposta piastrinica. Quindi, anche in questo caso, i problemi legati al Clopidogrel hanno costituito la base di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci. Il Prasugrel appunto, è sicuramente un farmaco che è sotto alcuni aspetti meno problematico del Clopidogrel, soprattutto per quanto riguarda il suo metabolismo. Esso infatti viene completamente trasformato dall'esterasi in un metabolita intermedio, e poi attivato da vari tipi di citocromi. Questo metabolismo è senz'altro più efficace di quello che abbiamo osservato nel Clopidogrel; infatti, mentre nel clopidogrel l'85% del farmaco viene inattivato, per il Prasugrel invece abbiamo una biodisponibilità del farmaco attivo molto superiore. Inoltre, il Prasugrel ha un inizio di azione molto più veloce, consente una maggiore inibizione dell'aggregazione piastrinica e presenta una minor variabilità interindividuale. Il trial clinico di riferimento che ha sancito la superiorità del Prasugrel rispetto al Clopidogrel è il TRITON TIMI-38, uno studio del 2007, uno studio multicentrico randomizzato e doppio ceco, nel quale sono stati arruolati oltre 13000 pazienti e randomizzati per la terapia con Clopidogrel o con Prasugrel. L'end point primario di questo studio era la combinazione di morte per cause cardiovascolari, infarto del miocardio non fatale e stroke

non fatale. E’ stato osservato che i pazienti in terapia con Prasugrel, rispetto a quelli in terapia con Clopidogrel avevano una diminuzione di oltre il 20% dell’end point primario. D’altra parte, i pazienti con Prasugrel avevano un aumento del 13% circa di eventi emorragici. A posteriori è stato osservato che per ogni morte per causa cardiovascolare che viene prevenuta dall’utilizzo del Prasugrel, piuttosto che dal Clopidogrel, si ha però un paziente in più che muore per emorragia severa.

In effetti, l’utilizzo del Prasugrel ad oggi è limitato dalle numerose controindicazioni che presenta questo farmaco, soprattutto bisogna fare molta attenzione al rischio di sanguinamento. Per questo motivo, nonostante per certi aspetti sia un farmaco superiore dal punto di vista della farmacocinetica ma anche dell’efficacia d’azione rispetto al clopidogrel, resta un dato di fatto che il clopidogrel nella pratica clinica sia ancora il farmaco di elezione per la maggior parte dei pazienti. Per superare le problematiche associate all’utilizzo del Clopidogrel, nel 2011 l’European Society of Cardiology suggeriva di monitorare il trattamento con Clopidogrel mediante l’analisi di test funzionali che andavano a misurare l’entità di aggregazione piastrinica dopo somministrazione del farmaco oppure suggeriva con gradi di raccomandazione piuttosto deboli la genotipizzazione. In effetti, la risposta ai test funzionali osservata in laboratorio (cioè la risposta ai test di aggregazione piastrinica dopo somministrazione del farmaco) dipendono da moltissimi fattori, non solo dalla biodisponibilità del farmaco stesso, ma anche da fattori clinici, genetici e cellulari.

Anche in questo caso quindi vediamo la somministrazione dei pazienti sulla base dei genotipi, così come viene suggerito dal consorzio internazionale per il Clopidogrel; oltre il 30% dei caucasici possono rientrare nel fenotipo di metabolizzatori ultra-rapidi, circa il 35-50% sono metabolizzatori estensivi o normali (wild-type), 18-45% della popolazione sono metabolizzatori intermedi e 2-15% dei pazienti sono metabolizzatori lenti. Sulla base di questa suddivisione le raccomandazioni ad oggi presenti in letteratura, sono di continuare la terapia con clopidogrel nei pazienti metabolizzatori ultra rapidi od estensivi, c’è poi una raccomandazione classificata come grado moderato che riguarda i metabolizzatori intermedi, per cui questo consorzio suggerisce di cambiare il farmaco e di somministrare il Prasugrel in questi pazienti. Un’altra forte raccomandazione è il cambiamento della terapia nel passaggio da Clopidogrel a Prasugrel per i metabolizzatori molto lenti, cioè gli omozigoti per le varianti sfavorevoli.

Anche nel caso del Clopidogrel l’FDA ha aggiunto delle informazioni al foglietto illustrativo di questo farmaco, tuttavia studi successivi al 2010 non avevano sottolineato nessun effetto significativo sugli eventi cardiovascolari in pazienti con sindrome coronarica acuta a seconda del genotipo, cioè: se anche nella pratica clinica abbiamo osservato che pazienti portatori di alcune varianti hanno una minore risposta al farmaco in termini di test funzionali, non è detto che poi questo si traduca in una maggiore predisposizione dei pazienti ad eventi clinici. Questo è un lavoro recente in cui si vede che i portatori di queste varianti alleliche hanno un rischio aumentato di eventi cardiovascolari (pari a circa 1%) ma questa differenza rispetto ai non portatori, quindi ai wild type non è statisticamente significativa. Quindi non è detto che i pazienti in terapia con Clopidogrel e portatori di varianti alleliche debbano poi avere un evento cardiovascolare. Per questo motivo, gli studi di farmacogenetica sul Clopidogrel stanno continuando e quindi in questo caso non è possibile pronunciarsi sull’applicabilità a livello clinico di questo strumento innovativo che è la farmacogenetica.

<u>In generale, quali sono i fattori che impediscono uno sviluppo preponderante della farmacogenetica nella pratica clinica?</u>

Sicuramente l’assenza di definizioni molto precise riguardo a come i clinici debbano interpretare i risultati della genotipizzazione, cioè come trasformare nella pratica clinica un referto del genotipo

di un dato polimorfismo. Mancano inoltre delle raccomandazioni precise riguardo ai singoli farmaci e ai rispettivi geni. Inoltre, esiste anche una certa resistenza da parte di alcuni clinici nel considerare queste informazioni farmacogenetiche che rappresentano una novità e che non sempre sono ben rappresentate in letteratura. Infine ci sono anche delle considerazioni economiche da fare, in quanto esistono attualmente molti strumenti che possono consentire la genotipizzazione dei polimorfismi di interesse, alcuni ad alto throwput, altri più economici, come la real-time PCR. Questo per esempio è un analizzatore genetico completamente automatizzato, consente di studiare numerosi polimorfismi implicati nella farmacogenetica di diversi tipi di farmaci, compresi Warfarin e Clopidogrel, permette di analizzare in un unico test tutti i test analitici di interesse. Purtroppo però essendo queste tecnologie molto innovative, i costi sono piuttosto elevati.

Terminiamo con un'applicazione della farmacogenetica che è già entrata nella pratica clinica, che riguarda il trattamento dell'epatite C. L'infezione cronica da epatite C colpisce circa 170 milioni di persone in tutto il mondo, e si stima che su 100 persone infettate dal virus solamente il 15% non sviluppa alcuna patologia cronica liberandosi dal virus grazie al proprio sistema immunitario. Il restante 85% invece sviluppa delle forme croniche della malattia con complicanze che evolvono in cirrosi epatica ed eventualmente carcinoma epatocellulare. Il trattamento dell'epatite C si distingue inizialmente a seconda del genotipo virale. I pazienti che hanno il genotipo virale 2 e 3 vengono trattati con la duplice terapia di IFN alfa peghilato e ribavirina, per 24-48 settimane. L'aggiunta di questa catena di polietilenglicole fa sì che l'emivita dell'IFN sia superiore e che quindi questo farmaco possa essere somministrato settimanalmente e non giornalmente. Per quanto riguarda i pazienti che hanno il genotipo virale 1 esiste ad oggi una doppia possibilità: la duplice terapia con IFN peghilato e ribavirina, che viene utilizzata per i pazienti con età inferiore a quaranta anni, carica virale inferiore a 100000 unita per ml, senza fibrosi epatica severa e assenza di insulino resistenza. I pazienti che invece non rispondono a queste caratteristiche vengono indirizzate alla triplice terapia che aggiunge un inibitore delle proteasi. Oltre a questi fattori che vi ho elencato, che indirizzano il clinico nella scelta della duplice o della triplice terapia nei pazienti con genotipo virale 1, è stato identificato nel 2009 un polimorfismo all'interno del gene che codifica per l'IL-28B, che sembra esser associato alla risposta virale sostenuta in questi pazienti.

Questo gene codifica per l'IFN-gamma3. Una citochina immunomodulatoria che regola l'espressione degli antigeni MHC-I. questo gene si trova sul cromosoma 19 in posizione q13.1 e l'effetto di questo polimorfismo è quello di aumentare la percentuale di declino della carica virale. Quindi aumentare la risposta virale sostenuta del paziente. In effetti rispetto le altre variabili cliniche e, diciamo, demografiche, che ho descritto prima, i portatori del genotipo favorevole di questo polimorfismo…. Questo polimorfismo rappresenta il fattore che spiega la maggior parte della variabilità alla terapia rispetto appunto agli altri fattori clinici e demografici.

Chi è che risponde meglio? In particolare hanno una maggiore risposta virologica sostenuta, i pazienti con genotipo CC di origine caucasica, dunque europei ed americani, rispondono invece in misura minore gli afroamericani, per ragioni non note.

Quindi una raccomandazione da parte della Società Italiana dello Studio del Fegato: i pazienti naïve di genotipo 1 con fattori predittivi di risposta positiva al trattamento, quindi genotipo favorevole CC dell'interleuchina 28 e fibrosi non severa, quindi inferiore a F3, la probabilità di eradicazione del virus supera l'80% con il solo utilizzo della duplice terapia, rendendo quasi assente o modesto in termini di aumento di probabilità di eradicazione dell'infezione, il guadagno di utilizzo della triplice terapia.

Quindi in questi pazienti con genotipo favorevole e senza fibrosi severa viene consigliata la triplice terapia. Pazienti invece con genotipo 1 e con fattori predittivi negativi di risposta, quindi genotipo

non CC di IL-28 e/o fibrosi elevata, la triplice terapia dovrebbe essere prevista come trattamento di prima scelta. E questa è una raccomandazione con elevato grado di evidenza (di livello A1). Inoltre è stato osservato che il genotipo CC non si associa solo ad una maggiore risposta virologica sostenuta nei pazienti in duplice terapia, ma quando associato in pazenti in triplice terapia, magari con fibrosi elevata, anche in questo caso nei pazieti in triplice terapia i wild type CC hanno una maggiore risposta virologica sostenuta. Inoltre, sempre in questa categoria di pazienti in triplice terapia, i pazienti con genotipo CC hanno un'eradicazione del virus in tempi molto più brevi rispetto ai portatori della variante allelica. È chiaro che in questi pazienti la possibilità di ridurre i tempi di trattamento va a giovamento del paziente nel momento in cui si riscontrano numerosi effetti collaterali sia per la duplice che per la triplice terapia.

In conclusione in pazienti con genotipo CC favorevole, si avrà una risposta virologica sostenuta solo con la duplice terapia, ma la triplice terapia può comunque portare ad un accorciamento dei tempi della terapia stessa in questi pazienti. Invece i pazienti con genotipo sfavorevole, cioè CT o TT, avranno maggiore possibilità di avere risposta virologica sostenuta quando sottoposti a triplice terapia.

Per concludere quindi qual è lo scopo finale della farmacogenetica? Quello di evitare tossicità ai farmaci. Migliorare la selezione dei farmaci e dei loro dosaggi. Questo ovviamente in considerazione di ogni singolo paziente. C'è da dire che l'FDA ha già introdotto dei foglietti informativi e indicazioni all'attenzione e allo studio di questi aspetti genetici. La farmacogenetica sta entrando con forza nella pratica.

La disponibilità di sistemi rapidi e potenti come i microchip che vi ho presentato prima stanno diventando disponibili a prezzi meno proibitivi. Sicuramente potranno avere un ruolo importante nella diffusione e nello sviluppo di questo tipo di analisi.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 16/5/2013 (1)

---

LEZIONE DI MEDICINA DI LABORATORIO

16/05/2013

Docente: dott. Giovanni Faccini

Sbobinatore: Francesca Turco

Revisore: Jacopo Fantinati

## TECNICA CROMATOGRAFICA

Questa tecnica di analisi diagnostica (che è associata all'utilizzo della spettrometria di massa) si basa su un principio diverso da tutte le altre tecniche, che è quello di **"separare"**. Mentre le altre

tecniche utilizzano alcune proprietà del composto che si vuole individuare e quantificare, per esempio le sue caratteristiche di assorbimento (utilizzando quindi uno spettrofotometro oppure la sua capacità di emettere fotoni se eccitato) oppure la sua capacità di essere substrato di un enzima o di essere un antigene e legare uno specifico anticorpo, la cromatografia, prima di usare la specificità del composto, cerca di separarlo da altre sostanze che possano interferire, perché ciò che cerchiamo è presente in quantità molto piccole rispetto al resto oppure c'è qualcosa che potrebbe interferire.

Questa tecnica è stata accoppiata negli anni alla spettrometria di massa, in modo che una volta separato il composto, questo viene identificato con certezza assoluta (100% di specificità). Le altre tecniche non danno il 100% di specificità, massimo 80%, però sono più veloci. Questa tecnica richiede manipolazione del campione, utilizzo di strumenti complessi e quindi richiede delle ore o addirittura dei giorni per arrivare all'esito.

Viene usata in campo clinico per separare le miscele complesse, mentre in medicina legale per esempio nel controllo di abuso di sostanze stupefacenti (obbligatorio per legge confermare la positività di abuso di droghe da parte di un soggetto con l'uso di questa tecnica); è usata anche nel controllo antidoping come validazione di record mondiali sportivi.

La prima cromatografia, quella di tanti anni fa (30-40), era la combinazione di una **fase stazionaria** e una **fase mobile**. La fase stazionaria (può essere una resina, o un polimero) è quella che lega le molecole di interesse. Naturalmente non è sempre uguale, perché a questa resina devono appartenere dei gruppi tali da essere capaci di legare la molecola di interesse, diversa volta per volta. La fase stazionaria sta ferma, è quella che lega il composto. Poi abbiamo la fase mobile che è un fluido (può essere un gas, liquido o fluido supercritico). Il campione, precedentemente diluito, per gravità si diffonde, si lega al primo granulo di resina che trova, incontra un altro granulo e così via.

Scegliamo la resina e la fase mobile in modo che il composto di interesse sia attirato con ugual forza da entrambi, altrimenti si lega troppo fortemente alla resina e non è più possibile rilevarlo. Allora il Ki ( *fattore di ritenzione* ) è un coefficiente che si misura dividendo la concentrazione nella fase stazionaria, cioè nella resina, per la concentrazione nella fase mobile. Questo valore deve essere circa 1. Se è >1 significa che la fase stazionaria attira di più il campione rispetto alla fase mobile.

Ci sono anche altri fattori che intervengono come variabili: il flusso, la pressione, la temperatura, ecc… e per ottenere la miglior separazione è necessario trovare la miglior combinazione di tutte queste variabili.

Nella cromatografia classica (vecchia) la colonna era disposta in verticale, oggi si usano strumenti con pompe, quindi la colonna è messa in orizzontale.

Supponiamo di avere un campione con solo 3 analiti, lo iniettiamo all'inizio della colonna e con una pompa spingiamo la fase mobile con il nostro campione. All'interno si separano gli analiti perché il campione A è più affine alla fase stazionaria, quindi sta legato qualche secondo in più al granulo, rispetto al campione B. Questa differenza, che è minima (i tempi di legame sono nell'ordine dei decimi di secondo), dopo dieci granuli trovati diventa un secondo di differenza (come in una gara ciclistica dove i ciclisti partono tutti assieme e poi arrivano in tempi diversi). In questo modo si riesce a separare i diversi analiti, che hanno diverse affinità con i granuli della fase stazionaria e

quindi diversi tempi di legame con essa e quindi un diverso tempo totale di attraversamento della colonna.

Vedi diapositiva:

Si vedono i 3 composti (rosso, blu e verde). Alla fine della colonna c'è un rilevatore. Qual è tra i 3 composti quello più affine alla fase stazionaria, quindi con Ki maggiore? Quello verde, perché rimane nella colonna più degli altri (sette minuti); forma infatti dei legami con la fase stazionaria più forti e quindi gli ci vuole più tempo per uscire dalla colonna ( ha accumulato un distacco dagli altri composti venendo a contatto con migliaia di granuli nel corso della discesa nelle colonna).

Ci sono tanti parametri cromatografici ( *poco importanti per noi, NdR* ): tempo di ritenzione, selettività, capacità, efficienza, numero di piatti, altezza del piatto, risoluzione,… Invece i parametri operativi ( pratici ) del sistema cromatografico sono: fase mobile, fase stazionaria, colonna, flusso, temperatura, gradiente (più fasi mobili variandole nel tempo). Tutti questi parametri bisogna combinarli provando e riprovando. È molto sperimentale come tecnica. Non c'è una linea guida sempre uguale, perché è dalla combinazione di tutti questi parametri che si trova il giusto compromesso.

La prima cromatografia è stata fatta nelle industrie per la produzione di benzine dal petrolio. I composti basso bollenti del petrolio, come pentano e esano, una volta scaldato il petrolio evaporano, cominciano a salire per colonne lunghe decine di metri, si raffreddano ma senza condensare ( hanno una temperatura di condensazione più bassa ), e man mano che salgono arrivano ad altezze diverse della colonna in base al peso molecolare e possono quindi essere prelevati. Quindi i composti a peso molecolare più basso arrivano alla sommità prima. Si separano così, in direzione cranio-caudale: benzine più leggere, benzine normali, gasolio, cherosene, nafta, catrame. E' quindi un esempio di **tecnica di separazione** ( distillazione frazionata ) **di composti diversi contenuti inizialmente nella stessa miscela.**

Efficienza della cromatografia: una colonna separa tanto meglio quanto più è lunga e quindi quanti più granuli ( cambiamenti di fase ) incontra. Ogni incontro con un granulo è un cambiamento di fase: prima il composto era nella fase mobile liquida, poi legandosi al granulo entra nello stato solido ( perché il granulo è solido ); quindi con la pressione si stacca dal granulo e ritorna nuovamente nella fase liquida, e così via. Quindi più la colonna è lunga, più granuli incontra. L'efficienza è direttamente proporzionale al numero di granuli:

E=radice quadrata di N (numero di granuli) diviso 4

Quindi l'efficienza è proporzionale al numero di granuli.

## Confronto cromatografia liquida (LC) e gassosa (GC)

La fase stazionaria è sempre solida ( la resina ), oppure liquida ma molto viscosa, tanto che la consideriamo solida. La differenza sta nella fase mobile, gassosa nella GC e liquida nella LC.

La cromatografia gassosa sarebbe migliore come resa e come caratteristiche, però richiede che il campione possa essere trasformato in gas. Le colonne nella cromatografia liquida sono lunghe 20-25 cm, nella gassosa anche 25-50-100 m. Nella cromatografia gassosa il composto deve essere volatile per farlo diventare gassoso; quelli volatili sono quelli a basso peso molecolare (fino a 500 dalton-UMA). Inoltre il composto deve essere stabile (nella GC) perché altrimenti nel riscaldarlo per evaporarlo si degrada. Nella GC si può cambiare la fase stazionaria in base alle caratteristiche del composto, ma non la fase mobile ( che è sempre l'elio ).

La cromatografia liquida richiede invece che il campione sia solubile nel solvente utilizzato ( la fase mobile ). Bisogna rispettare le caratteristiche chimiche del campione: se il composto è organico apolare utilizziamo solventi apolari, oppure cambiamo il pH del solvente, … Inoltre possiamo trattare anche campioni instabili, lavorando per es. in stanze fredde; **la LC quindi va molto bene per campioni biologici dove le molecole spesso sono instabili. La LC è molto più utilizzata in campo biochimico ( 90 % dei casi ).** Si possono trattare campioni di qualsiasi peso molecolare (anche le proteine). Si può selezionare inoltre sia la fase stazionaria ( come nella GC ) sia la mobile ( si possono cambiare le caratteristiche del solvente in base all'analita preso in esame ). In passato i rivelatori nella LC erano meno sensibili rispetto alla GC ma oggi si è raggiunta una buona sensibilità anche in LC.

## HPLC

Nel tempo si è visto che la cromatografia a mano è lenta, non riproducibile, quindi si è cercato di automatizzarla; oggi si fa la cromatografia utilizzando alcuni strumenti ( come pompe). Inoltre è una cromatografia più "piccola". Mentre prima i granuli ( della fase stazionaria ) erano di 50 micron, ora con la cromatografia strumentale sono di 5 micron in giù. La cromatografia ultra arriva fino a un micron ( più accuratezza ).

HPLC: high performance liquid cromatography.

La fase mobile si trova in un recipiente e viene aspirata da una pompa. Più a valle c'è una zona termostatata dove all'interno c'è la colonna (di 25 o 10 cm). Il campionatore prende il campione e lo inserisce nel flusso. Una precolonna serve per catturare le impurità che rischiano di intasare la colonna, e viene cambiata spesso. A fine colonna troviamo il rilevatore.

Il campione non viene inserito subito nello strumento per effettuare la cromatografia; lo strumento è solo lo step finale della separazione dei composti.

Precedentemente a ciò si fanno altre operazioni per effettuare una prima sommaria separazione dei diversi composti contenuti nella miscela e separare l'analita di interesse da tutte le altre sostanze interferenti ( per es. estrazioni, concentrazioni, precipitazione di proteine, separazione di diverse famiglie dei composti, come per es. vitamine da proteine, … ). Tuttavia, con tutte queste manipolazioni manuali, precedenti all'utilizzo dello strumento, può succedere di trattare un campione in modo diverso da un altro. Per ovviare alle differenze di trattamento e rendere il più possibile riproducibili e affidabili le cromatografie, si usa una taratura esterna e lo standard interno. Lo scopo è trattare ogni campione alla stessa maniera, senza che ci siano differenze nei risultati dovuti alla procedura sperimentale; ogni differenza di risultato deve essere dovuta a un'effettiva

differenza dei campioni presi in esame, e non magari ad errori sperimentali avvenuti nella fase manipolativa precedente l'utilizzo dello strumento cromatografico ( che invece è automatizzata e " affidabile" ): bisogna cercare di normalizzare la procedura sperimentale manuale.

Prima di iniziare a manipolare il campione iniettiamo lo stardard interno. Lo standard interno è una sostanza che non è presente nell'organismo ( e quindi nel campione ) ma che è molto simile chimicamente all'analita di interesse ( per es. l'analita di interesse e lo standard interno differiscono solo per la posizione di un gruppo metile).

*Uno standard interno in chimica analitica è una sostanza chimica che viene aggiunta in quantità esattamente nota ai campioni in un'analisi chimica. Questo espediente consente di correggere la perdita dell'analita durante la preparazione del campione o la sua introduzione nel sistema di misura, assumendo che lo standard interno subisca una perdita analoga. Per questa ragione lo standard interno è un composto che deve comportarsi in maniera simile alla specie chimica di interesse nei campioni, dato che gli effetti della preparazione del campione devono essere il più simili possibile sul segnale dello standard interno e dell'analita nel campione. Il rapporto fra i due segnali (analita/standard interno) viene poi usato per ottenere la concentrazione effettiva dell'analita. ( NdR)*

## Esempi di dosaggi effettuati in laboratorio

-Dosaggio di tumori solidi delle surrenali: ci sono varie tendenze. Tempo fa si dosava acido vanilmandelico o omovanillico per diagnosticarlo, oggi si preferiscono catecolamine e metanefrine. Il dosaggio viene effettuato non solo nelle urine ma anche nel plasma. Le catecolamine sono noradrenalina, adrenalina e dopamina. Un tempo si dosava l'acido vanilmandelico o omovanillico perché sono metaboliti finali delle catecolamine, quindi se aumentano le catecolamine anch'essi aumentano. Si dosano nelle urine perché le catecolamine sono labili, durano poco nell'organismo, vengono subito degradate, e quindi i prodotti di degradazione li troviamo nelle urine. In alternativa posso dosare direttamente le catecolamine urinarie o plasmatiche (la concentrazione nel plasma è 100 volte inferiore rispetto alla concentrazione nelle urine) e anche la dopamina.

Prima si fa cromatografia per separare le catecolamine; la catecolamine che sono rimaste attaccate alla resina vengono quindi distaccate tramite un composto che si attacca alle catecolamine più fortemente rispetto alla resina ( eluizione ). Sono però in concentrazioni bassissime. Le catecolamine sono fluorogene,cioè emettono luce se irradiate da radiazioni elettromagnetiche da 400 nm; legandole poi a un fluoroforo ( difenil etilendiammina ) si potenzia ulteriormente il segnale fluorescente

-Un altro dosaggio è quello della 5idrossitriptamina o serotonina nel sangue intero, e del suo metabolita urinario acido5idrossi indolacetico nelle urine. Sia la serotonina sia il suo metabolita aumentano molto anche nei tumori solidi.

-Altri dosaggi routinari sono fatti per farmaci antiepilettici. Non si dosano con la cromatografia farmaci ampiamente utilizzati (per cui esistono dei kit e che vengono dosati con metodi

automatizzati), ma quelli che hanno basso potere terapeutico, ossia che hanno bisogno di maggiori concentrazione per agire. Si dosa l'oxcarbazepina e lamotrigina e ache zonisamide e topiramato.

-Altra molecola che si dosa con la tecnica cromatografica è la MDA (malondialdeide) nei processi lipoperossidativi a carico delle LDL.

-Si dosano anche antifungini ( specialmente per pazienti onco-ematologici ): itraconazolo, posaconazolo e voriconazolo, quest'ultimo soprattutto è molto tossico quindi deve essere monitorato. Si dosa anche linezolid ma è poco richiesto.

-Un'altra branca è quella delle porfirie e porfirinurie. Sono malattie rare, rilevabili per una alterata escrezione nelle urine di alcuni composti. Difetti parziali di attività enzimatiche che interessano la sintesi dell'eme portano ai vari tipi di porfiria. Nelle varie tappe metaboliche che portano alla formazione dell'eme, se manca un enzima di una tappa, il metabolita a monte si accumula ( quello su cui dovrebbe agire l'enzima ).

## Cromatografia gassosa

Si potrebbero usare 3 gas come fase mobile.

L'H si poteva usare ma si è visto che è pericoloso, l'N si usava un tempo ma si è visto che alle alte temperature interferisce, invece usiamo l'He perché è inerte ( essendo gas nobile e avendo già l'ottetto elettronico non interagisce ).

Le colonne sono lunghe decine di metri, hanno un diametro di 0.2 mm e granuli ( fase stazionaria ) di 0.2 micron. Attaccate alla parete ci sono i granuli, al centro c'è solo l'He; questo è lo stato di massima libertà, c'è poca interferenza: le molecole non si attraggono molto, mentre nel liquido si attraggono di più. Poi la lunghezza (dai 30 ai 100m) della colonna nella GC fa si che ci sia meno attrazione, c'è una separazione ottimale. L'He fluisce, si inietta il campione all'interno, con l'He questo viene trasportato nella colonna, separato, e il rivelatore ne misura la quantità.

( Confronto gas-liquido: nella LC la colonna è lunga 10-20 cm, nella GC 50-100 m; il numero di granuli ( e quindi di cambiamenti di fase ) nella LC è 8000 massimo, nella GC ne abbiamo anche 700.000 ( maggiore risoluzione ) ).

Si scalda il composto cosi che vada in fase vapore, almeno 100 gradi. Però nell'esempio abbiamo una miscela di nove componenti, alcuni alto bollenti, altri basso bollenti. Se teniamo la temperatura bassa facciamo passare in fase di vapore solo quelli a peso molecolare basso; gli altri rimangono invece liquidi. Se teniamo invece la temperatura troppo alta ( 150-200 gradi ), quelli basso bollenti passano allo stato di vapore tutti insieme e non li separiamo, quindi non raggiungiamo lo scopo del test. Allora si adopera la programmazione della temperatura: aumentiamo gradualmente la temperatura cosi da far uscire tutti i componenti e ben distanziati.

Quindi abbiamo separato il composto con la cromatografia.

Ora dobbiamo usare lo **spettrometro di massa** per identificare con certezza la natura del composto.

## Spettrometro di massa

È formato da 3 parti: la **sorgente**, **l'analizzatore** e il **rivelatore**. La sorgente serve per produrre ioni. La nostra molecola deve essere ionizzata; di solito si estrae un elettrone così diventa ionica, oppure si fa una ionizzazione negativa ( ossia si danno elettroni alla molecola, nel caso in cui sia più portata a riceverne ), oppure si frammenta: tutto ciò in modo che la molecola diventi carica.

L'analizzatore va a vedere i vari frammenti e il rivelatore li conta.

Esempio su Acido benzoico:

Nel diagramma dello spettro di massa si trovano il numero di frammenti in ordinata e in ascissa il peso dei frammenti, da 0 a 120. Il campione viene messo in un liquido (l'esempio è con la LC, perche è usata di più nel campo clinico). Il primo scopo è eliminare tutte le molecole che non servono: si fa un vuoto di 10allamenosette atm con più pompe in modo da eliminare tutte le molecole del solvente. La fase mobile viene eliminata così che rimangono solo le molecole cariche del composto ( oltre a poche altre ). Una volta che ho queste poche molecole, esse entrano in una scatola con 2 aperture, una in alto e una in basso. Il composto viene spinto. Un tipo di ionizzazione è a impatto elettronico (o elettrospray): mando un fascio di 70 elettronvolt ( un denso fascio di elettroni ) in modo che colpendo la mia molecola la rompa. Si rompe il legame della molecola più polarizzato. L'anello benzoico è molto robusto quindi non si rompe subito, invece se guardiamo il gruppo carbossilico ( -COOH ), c'è un legame debole (la debolezza del legame dipende dalla polarizzazione, cioè dalla differenza di elettronegatività tra i due elementi del legame, che in questo caso è molto alta; la nuvola elettronica è spostata verso l'ossigeno piuttosto che verso il carbonio). Il primo gruppo che si stacca ( nell'altro c'è un doppio legame tra C e O ) è infatti l' –OH ( massa molecolare 16 + 1= 17 ), quindi il composto, che aveva una massa molecolare di 122 ora la avrà di 105 ( 122 -17 ). Questo però può essere investito da altri elettroni, e quindi l'altro legame che si rompe è il –C=O ( massa molecolare 12 + 16= 28 ); ora la molecola avrà massa molecolare di 105 – 28= 77. La molecola può essere poi bombardata ulteriormente per rompere altri legami. L'insieme dei frammenti della molecola più la loro abbondanza fanno lo spettro di massa.

Nelle librerie elettroniche si possono consultare gli spettri degli specifici composti. Confronto il mio spettro con quelli riportati nella libreria, quando coincidono perfettamente ho trovato che composto è. Più il peso molecolare del composto è elevato più è sicura l'identificazione; questo perché per es. con un peso molecolare di 40 esistono moltissimi composti mentre di 850 molto meno.

Questi frammenti ( del peso molecolare di 17, 28, 77, … ) arrivano al rilevatore e sono tutti frammenti positivi, ma con masse diverse; bisogna fare in modo che arrivino in tempi diversi in modo che il rilevatore conti la molecola A poi la B e poi la C ecc. Di solito c'è un grande magnete che avvolge la parte finale dello spettrometro. Applico un campo magnetico e un campo elettrico. Cambiando il campo magnetico c'è solo un frammento che fa una determinata traiettoria e arriva al rilevatore. Le altre molecole, avendo massa diversa, urtano contro le pareti, rallentano e vengono

portate allo scarico. Variando il campo magnetico continuamente facciamo arrivare al rilevatore i vari frammenti.

Un altro metodo molto usato è il quadrupolo. Ci sono 4 barre di acciaio inox in cui il campione ionizzato “risuona” (mentre il campo magnetico è costante, il campo elettrico varia col coseno di omega per t: moto sinusoidale) in modo che arrivi al rilevatore un solo tipo di frammento in quell’istante, poi un secondo dopo un altro e così via; questo si ottiene cambiando il coseno di omega per t.

Si possono dosare gli acidi grassi sia nella membrana dei globuli bianchi, globuli rossi oppure nel plasma.

Un altro dosaggio è quello degli steroidi (26 steroidi, tra ormoni sessuali maschili e femminili e ormoni surrenali); si può studiare la deficienza della 17 alfa ossidasi.

---

# Lezione di Metodologia clinica e medicina di laboratorio del 23/5/2013 (1)

---

Data: 23/05/2013

Sobinatore: Elisa Zanetti

Revisore: Annalisa Franchini

Dottor Salvagno

**TROMBOFILIE: DALLA BIOCHIMICA ALLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE**

La Trombofilia è una patologia di notevole importanza, infatti il senato americano, nel marzo del 2005, dichiarò il mese di marzo come il mese delle trombofilie.

Il mese di marzo perché?

Caso di David Bloom: David Bloom era un giornalista americano dell’NBC che a 39 anni nel 2003 si reca a Bagdad, arriva dopo la presa di Bagdad nel fine marzo 2003 e muore dopo l’atterraggio per insufficienza respiratoria acuta. Melanie Bloom, la moglie, fa del caso che è successo una occasione di diffusione e di comunicazione perché il marito è morto per insufficienza respiratoria acuta dovuta ad embolia polmonare a seguito di una trombosi venosa profonda ( dal punto di vista clinico era una insufficienza respiratoria acuta).

Il suo è un caso clinico da libro. Era proprio il classico caso di embolia polmonare: aveva fatto un lungo volo in areo seguito da un tragitto in un tank con truppe americane dove le persone stanno rannicchiate; quindi immobilizzazione, disidratazione e, post mortem, è stata trovata una mutazione a carico del fattore V di Leiden in forma eterozigote. Quindi aveva avuto dei fattori di rischio acquisiti ( immobilizzazione e disidratazione) ed altri ereditari.

Questa patologia ha una frequenza elevata.

La trombosi venosa profonda, che fonda le sue radici eziopatogenetiche estremamente nel passato ed è ancora estremamente attuale, è nota come coagulopatia di Virchow.

Virchow fu un anatomopatologo tedesco che nel 1856 pose le basi della teoria fisiopatologica della TVP che, ad oggi, è estremamente attuale. TVP che pone le basi su una situazione di stasi, vimmobilizzazione e su una situazione di ipercoagulabilità come lui la definì, non sapendo il perché aveva però intuito che c'erano delle condizioni predisponenti che aumentavano il settore procoagulante -anticoagulante sul versante procoagulante, e sul danno endoteliale.

Il danno endoteliale è un elemento cardine perché fondamentalmente causa l'esposizione di una proteina centrale nel sistema co-emostatico che è il fattore tissutale detta anche tromboplastina. Noi in laboratorio la chiamiamo tromboplastina, ma in realtà è un mix, cioè una miscela racemica fatta di fattore tissutale e di fosfolipidi. La tromboplastina propriamente detta è l'insieme dei due, della proteina che è il fattore tissutale e dei fosfolipidi. Quando c'è un danno endoteliale si verifica l'esposizione sul versante luminale di fattore tissutale che è una proteina ubiquitaria del sottoendotelio.

Virchow pone le basi della TVP.

E' una patologia (riguardate il teorema di Bayes perché anche l'epidemiologia ha la sua importanza) che sul versante della popolazione americana ha 100 casi circa per 100000 abitanti, quindi 1 caso ogni 1000 abitanti (a Verona sarebbero 1000 casi all'anno ).
Quando si parla di epidemiologia bisogna parlare del concetto di popolazione cioè di gruppi di soggetti che magari hanno avuto minori rapporti per mancanza d'immigrazione o altro con altri gruppi e quindi dal punto di vista genetico noi abbiamo delle modifiche di fatto ( ad esempio l'anemia falciforme da noi è estremamente rara però a livello del golfo di Guinea abbiamo un incidenza eterozigote del 30 -40 %). Anche riferendosi alla TVP, quando si parla d'incidenza, i dati sono sulla popolazione americana e su quella europea è molto simile in realtà.

Quando si parla di questa patologia si parla di TVPE, trombosi venosa profonda ed embolitica, infatti si parla di questa patologia come tromboembolismo.

Quando si parla di studi d'incidenza è interessante valutare la stratificazione nella popolazione, cioè si è visto che in realtà quell'incidenza 1/1000 è una media perché se noi andiamo a studiare (grafico di TVP senza associazione con embolia polmonare di sx sulle slide ) siamo su 0, 1-0, 2 su 1000, cioè 1-2 su 10000, fino grossomodo ai 50 -55 anni, poi l'incidenza cresce vertiginosamente. Quell'1/1000 viene raggiunto verso i 70 anni e poi continua a crescere. E' cioè una patologia anche correlata con l'età. L'unico medico che non vedrà mai questo tipo di paziente è il pediatra. In realtà anche il pediatra ha delle problematiche legate alla TVP, ma per fortuna estremamente rare. E' soprattutto una patologia che interessa la popolazione geriatrica, che per definizione è dai 65 anni in su. Grosso modo verso i 65-70 anni si ha un'impennata che riguarda sia femmine che maschi. Il

grafico di dx vuole aggiungere anche i dati di associazione tra tutti gli eventi tromboembolici, perché a volte si ha un paziente con embolia polmonare ma non è chiara la sede, cioè fisicamente viene visto dalla TAC un embolo ma magari non è chiara la sorgente cioè da dove fisicamente questo embolo sia arrivato. Infatti si parla spesso e volentieri di tromboembolismo nel suo insieme che è la linea più alta e poi dei due eventi separati che sono la TVP da sola e la TVP associata ad embolia polmonare che è la linea in mezzo. Anche qui si ha correlazione con l'età.

**PARTE DI FISIOPATOLOGIA**

I settori maggiormente colpiti dalla TVP sono fondamentalmente le vene profonde dell'arto inferiore. Quindi principalmente colpite sono la poplitea, la safena, la femorale profonda, la iliaca. Dal punto di vista anatomico si ricorda che le vene dell'arto inferiore hanno le classiche valvole ed una zona particolarmente trombogenica è proprio la zona vicina alle valvole.

A livello di schema questo riassume quello che si è visto in coagulazione o meglio in emostasi, perché la coagulazione è una parte dell'emostasi. A livello emostatico soprattutto vedete, il flusso va da destra a sinistra, nella parte posteriore della valvola ci sono delle zone a maggior stasi cioè si riduce la velocità del tessuto ematico. Può esserci una qualche lesione, perché chiaramente la cellula endoteliale non è eterna (la cellula endoteliale può subire anche dei danni ). Questi danni della cellula endoteliale, la riduzione del flusso e condizioni predisponenti, quindi si parla di trombofilie ( sarebbe quella ipercoagulabilità che diceva Virchow), di fatto stanno spostando sul versante procoagulante e quindi si va a formare quello che viene chiamato trombo. Un trombo fino a che è in sede è un insieme, dal punto di vista biochimico, di fibrina, che è la proteina centrale del coagulo finale, e di tutto quello che va ad inglobare, tessuto, eritrociti, piastrine, globuli bianchi (1 su 1000, infatti la maggior parte dei trombi saranno trombi rossi e non bianchi); vi ricordo che una volta la piastrina si chiamava trombocita perché appunto nel trombo c'è una grande quantità di piastrine.

Nel momento in cui fisicamente una parte si stacca questo si chiamerà embolo. Chiaramente l'embolo è la complicanza grave della trombosi venosa profonda perché la trombosi in realtà fin che confinata all'arto inferiore dà "solamente" una serie di problematiche cliniche, dolore e gonfiore. In clinica classica la trombosi venosa profonda non è altro che un aumento di diametro, purtroppo oggi si vede sempre meno invece tanti anni fa in reparto si aveva l'abitudine di avere un metro con cui misurare le circonferenze del paziente, oggi invece si usa il doppler. La trombosi venosa profonda è una diagnostica clinica. Classicamente si ha di fatto un'ostruzione del vaso venoso, quindi chiaramente un aumento della pressione idrostatica e una imbibizione del terzo spazio. Si ha cioè un aumento di diametro della porzione di arto che non riesce più chiaramente a scaricare e sull'altro versante si vede un aumento del turgore delle vene superficiali perché la vena profonda è chiusa. Poi in semeiotica si farà il segno di Homan, la dorsoflessione del piede, la dolorabilità (l'arto trombotico è un arto del quale il paziente lamenta dolore fisico, fa fisicamente fatica a camminare).

Però fino a quando il trombo resta lì in realtà prende il piede, l'arto inferiore; il problema sta quando un pezzettino si può staccare, quindi riguardando l'anatomia, arriva all'iliaca, cava inferiore, atrio di destra, ventricolo di destra, arteria polmonare, l'embolo va avanti fin dove passa. Chiaramente arriva a un punto in cui s'incastra, il caso peggiore in assoluto è che l'embolo s'incastri nel punto di biforcazione dell'arteria polmonare causando l'embolo a cavaliere, a sella cioè il trombo va un po' a destra ed un po' a sinistra. E' il caso peggiore perché quel paziente lì di fatto nel giro di pochi minuti ha un'insufficienza respiratoria acuta gravissima che porta purtroppo a situazioni nefaste dal punto di vista di decorso clinico perché viene completamente interrotta la capacità degli scambi. Difatti il primo sintomo ovvio è la dispnea. Il problema è che la dispnea è un

sintomo riferito dal paziente assolutamente eterogeneo, poi su un paziente anziano chi è che non ha la dispnea.

Dovete immaginare di essere medici su territorio, medico del pronto soccorso, medico che fisicamente arriva su paziente che riferisce dispnea. Il biochimico viene sempre dopo, è utile sulla diagnostica di patologie complesse, sulla valutazione del decorso clinico. Della trombosi venosa profonda al biochimico interessa soprattutto l'eziopatogenesi, il perché è come si scatena l'evento.

L'evento si scatena quando si ha una lesione endoteliale. Si ha a disposizione fattore tissutale che è il primum movens del sistema emostatico. Per emostasi s'intendono tutti i fenomeni fisiologici che riguardano tutte le contromisure prese dall'organismo per riparare il danno endoteliale. Quando si parla di coagulazione invece s'intende un sotto capitolo dell'emostasi. E' un sottocapitolo a sviluppo verticale perché la coagulazione è importante all'inizio, durante e alla fine. La coagulazione è un insieme di fattori paralleli non sequenziali. Cioè in vivo gli eventi non sono così sequenziali come allo studente viene spiegato ( emostasi primaria e secondaria). Infatti il primum movens è il fattore tissutale che però è contestuale all'esposizione di collagene, perché c'è il collagene sotto l'endotelio.

Quindi la piastrina che sta girando liberamente aderisce al collagene ma contestualmente il fattore tissutale non è lì che aspetta, il fattore tissutale fa il suo dovere che è essere il cofattore, è un acceleratore in un enzima che è normalmente e fisiologicamente presente che è il fattore VII attivato. Se lo si misurasse a noi normalmente non si troverebbe zero ma una piccola quantità di fattore VII attivato circolante. Il fattore tissutale non è l'attivatore del VII, è un cofattore cioè un acceleratore di attività. Perché c'è questo VII attivato circolante? Ancora oggi non è chiaro. Ci sono una serie di studiosi che stanno cercando di capire perché abbiamo un VII attivato circolante costantemente presente. Il punto chiaro deve essere che noi abbiamo sempre il motore in folle, cioè avere il VII attivato è come avere il motore sempre acceso però in folle. Ma il VII attivato senza in fattore tissutale che fa da enhancer quanta attività ha? Estremamente bassa tale da non riuscire da solo a fare il suo mestiere fisiologico che è attivare il X. L'obiettivo fondamentale del fattore VI attivato è attivare il X. Il segreto della coagulazione è produrre X. Da solo il fattore VII non ce la fa, ne fa poco.

Nel 1856 Virchow aveva capito questa cosa ma non aveva i meccanismi biochimici per spiegarla. Ancora oggi nel 2013 non è chiaro e a livello mondiale sono pochi ancora oggi i ricercatori che studiano questi aspetti. Quello che è chiaro è che il VII attivato circolante c'è. Sul VII attivato si è molto speculato. Ad esempio nel 2000 il VII attivato era un argomento molto interessante per chi faceva cardiovascolare perché i soggetti che avevano un VII attivato più alto di altri soggetti sembravano avere un maggior rischio cardiovascolare perché in realtà è chiaro che la coagulazione avviene sempre e comunque. La sintomatologia dipende dall'organo che colpisce. Cioè l'infarto del miocardio è in realtà un evento emostatico. Poi il danno si chiamo del miocardio perché stiamo parlando di cuore, se parlassimo invece di un altro settore ha un'altra clinica. La coagulazione è importante perché in realtà è centrale nello stroke in neurologia, nell'infarto del miocardio, in patologie chirurgiche e altro.

Abbiamo un VII attivato circolante. Il fattore tissutale, il cofattore, accelera enormemente la sua attività. Il VII attivato attiva poi il X, ma attiva anche il IX.

Ma contestualmente cos'è avvenuto alla piastrina? Adesione, attivazione, shape change. Dopo l'adesione al collagene, ci sono delle modificazioni post-trasduzionali che attivano la piastrina. Quando si attiva la piastrina essa degranula. Interessano però degli altri fenomeni che avvengono sulla piastrina attivata e quello che più interessa, da biochimico, è il flip flop dei fosfolipidi. Cioè si

ha una modifica della disposizione di fosfolipidi: la serina in particolare, che è, normalmente, prevalentemente citosolica, viene esposta sul versante luminale. E' fondamentale perché il VII attiva il X ed il IX solo se sono attaccati ai fosfolipidi e per legarsi ai fosfolipidi ci deve essere la serina con le sue cariche negative, se no non si legano.

Sono fenomeni che vanno avanti di parallelo, se manca uno l'altro non avviene. Se un paziente è piastrinopenico è chiaro che per quanto la coagulazione sia fortissima mancano le basi perché avvenga. Nella patologia emorragica da piastrinopenia, a chi farà chirurgia, si consiglia sempre di contare quante piastrine ha quel soggetto perché se non ci sono le piastrine non si va da nessuna parte perché manca la base a cui si legano il IX ed il X.

Il X attiva la trombina, da protrombina la trasforma in trombina. Però non ne produce tanta ed infatti è il IX coadiuvato dall'VIII che produce grandi quantità di X. Questo è il loop che potenzia enormemente il sistema coagulativo in vivo. Questo X aumenta esponenzialmente la produzione di trombina. La trombina trasforma il fibrinogeno in fibrina ma soprattutto è il più potente attivatore piastrinico. Già in realtà il collagene è un debole attivatore piastrinico. La piastrina sulla sua superficie ha una serie di recettori fra cui il recettore per la trombina, che è il suo più potente attivatore. Talmente potente che se c'è la piastrina che passa in giro la trombina l'attiva. E' in quel modo che il tappo emostatico cresce. Quindi è la trombina il più potente attivatore piastrinico.

La trombina, altra funzione fondamentale, è il più potente attivatore retrogrado, perché in realtà è lei che attiva tutti gli zimogeni che ha a monte. Quindi la trombina attiva il X, il IX, l'XI. E' quindi un enhancer, un acceleratore di attività.

La trombina in realtà fa un'altra importantissima funzione, perché altrimenti saremo già coagulati, che è essere un potente attivatore del più potente sistema anticoagulante. Va ad attivare il sistema anticoagulante che è il sistema proteina C proteina S. La trombina va a legarsi alla trombomodulina, proteina ubiquitaria presente da ogni parte nel sistema endoteliale. Quando si lega alla trombomodulina va ad attivare la proteina C, solo se questa è legata all'EPCR (recettore endoteliale della proteina C). Questo è importante perché regola finemente il rapporto che sussiste tra il procoagulante e l'anticoagulante. La proteina C è una proteina vitamina K dipendente circolante. La lettera C non c'entra nulla con la coagulazione. Johan Stenflo quando la scoprì disse banalmente che era la proteina che aveva individuato da 60 KD nel tubo di raccolto dell'eluato dopo una cromatografia che aveva fatto per separare le proteine, nel tubo c ( quindi non chiamatela "della coagulazione" anche se tutti la chiamano così). La proteina C vitamina K dipendente viene attivata dalla trombina e quando attivata va a tagliare a pezzettini, a clivare, i due cofattori, che sono il fattore VIII ed il fattore V.

Nel sistema trombotico vi è una dicotomia tra quello che avviene in vivo e quello che viene in vitro. Nel senso che il sistema trombo attivo che viene spiegato è questo perché questa visione (togliete la freccia tra VII e IX ) è esattamente l'immagine che Farrar nel 1965 pubbicò per la prima volta e che descrisse come la cascata coagulativa, perché in coagulazione c'era una grande confusione. Questa confusione si capisce dalla nomenclatura perché è irrazionale. Qui si parte da sotto con il I, II, V, X, IX, VIII, XI, XII poi c'è il VII. Non è razionale perché i fattori della coagulazione furono scoperti via via ed il primo scoperto fu la trombina(1890).

Furono scoperti molto spesso anche in pazienti con carenze in determinati fattori.Il più famoso di tutti è Hageman, il XII.

Per tradizione si sono rispettati i numeri romani. Si è capito poi che c'erano dei buchi: il III non c'è, ma avevano già nominato il IV (è scomparso perché oggi lo chiamiamo in altro modo, è il calcio); il VI non c'è.

Farrar ha fatto un po' di ordine: ha capito che il XII attivava l'XI che attivava il IX che attivava il X che attivava il II, e ha capito che alcuni fattori erano zimogeni e che alcuni fattori erano cofattori. Il limite sta però nei metodi da lui utilizzati che sono due metodi di laboratorio tra i più utilizzati: il tempo di tromboplastina parziale attivato e il tempo di protrombina.

Il tempo di protrombina è il tempo di Quick. Descrive l'attivazione del VII, X e II. Il tempo di protrombina è quel procedimento in cui il laboratorio aggiunge al plasma del citrato che agisce da anticoagulante, cloruro di calcio (fattore IV) e tromboplastina.

Quando si sono resi conto che in realtà questo vedeva solo una parte dei fenomeni, migliorarono la purificazione di questa tromboplastina a tal punto da che si vedeva qualcosa di diverso e lo chiamarono tempo di tromboplastina parziale. Il parziale sta ad indicare che loro avevano capito che avevano perso qualcosa e quel qualcosa è il fattore tissutale. Questa tromboplastina parziale è solo fosfolipidi senza fattore tissutale. La tromboplastina è il fattore tissutale con i fosfolipidi, La tromboplastina parziale è solo fosfolipidi senza fattore tissutale che si chiama PTT e descrive la così detta via intrinseca.

Fu chiamata intrinseca perché l'altra fu chiamata estrinseca.

Estrinseca perché ci si è resi conto che per farla partire era necessario qualcosa di esterno: il fattore tissutale. Di converso l'altra fu chiamata intrinseca. Una fu chiamata della fase di contatto perché il sangue nel vetro coagula perché il vetro è fatto di silicio. Quindi il contatto con delle superfici fa coagulare. L'altra fu chiamata di converso Via del danno tissutale.

Questa visione cozza però con la clinica perché se ho un paziente emofilico di tipo A, cioè carenza di fattore VIII, o tipo B, carenza di fattore IX, l'altra via perché non ce la fa? Di converso qual è l'altro errore che si fa? Considerare che se il PTT è allungato il paziente è scoagulato (è un Assioma ). In realtà la risposta è: è anche scoagulato.

Il classico caso che cozza contro questa visione è il paziente carente di fattore XII, che è un deficit tutt'altro che raro nella forma eterozigote dove si ha una riduzione di Hageman, nel quale la PTT si allunga. Non si ha rischio emorragico ma semmai, molti stanno speculando, sull'aumentato rischio trombotico. Non sono ancora chiari gli studi sulla funzione del XII. Sembra che addirittura il XII in realtà svolga una qualche attività più sul versante procoagulante (*anticoagulante? ndr*). Quindi la sua assenza aumenta il rischio procoagulante però la PTT è allungata.

Quindi bisogna uscire dal discorso PTT allungato vuol dire scoagulato e PTT accorciato procoagulato. E' vero ma è anche vero il contrario.

Questo ha posto le basi ai clinici per mettere in discussione questa visione che è una visione che non va accantonata perché la si deve applicare ogni volta che avete un PT e un PTT perché questo è quello che avviene in vitro.

Quando si va ad interpretare una PTT bisogna tenere conto di questa visione. Perché una PTT allungata può essere carenza di XII, può essere un emofilico, VIII e IX, ma può essere anche un paziente in eparina, può essere anche un paziente che ha un'aumentata presenza di anticorpi antifosfolipidi quindi riduce la possibilità dei fattori di coagulazione di legarsi ai fosfolipidi perché

ci sono questi anticorpi che coprono, occupano spazio, e questo determina un allungamento del tempo (questa è una delle principali cause di trombofilia).

Quindi la PTT allungato vedete quanti risvolti ha, a seconda della condizione clinica del paziente. Questo vale anche per il tempo di protrombina.

Fu la freccia tra VII e IX cambiò le carte in tavola, perché ci si è resi conto che il VII è il più potente attivatore di IX. (slide )

In vivo la coagulazione è l'amico silenzioso che lavora sempre e comunque. Quando si ha un paziente con poche piastrine l'emorragia non è perché sta tagliandosi o altro ma è sempre sospetta, ecco perché è un'emergenza medica 10000 piastrine o meno perché la coagulazione lavora sempre.

Il primum movens è l'esposizione di fattore tissutale. In vivo quello è il cardine. Fattore tissutale che è il cofattore del VII che attiva IX e X. Il X nella via più breve attiva subito il II trasformandolo in trombina che poi va per la sua strada. La velocità la pago con una bassa produzione di X. Il segreto della coagulazione perché avvenga il sistema procoagulante è che ci sia produzione di X più veloce perché non posso aspettare. Il X della coagulazione è veloce perché deve riparare immediatamente il danno, però è debole e infatti c'è quel loop del IX che attiva grandi quantità di X. Quello è il motorino. L'emofilico sanguina perché non ha quel complesso che si chiama complesso intrinsecasico ( pezzetto di via intrinseca ). Quello che è più importante è l'estrinsecasico perché dà la partenza, l'intrinsecasico dà la sostanza. E poi il X è l'elemento centrale per produrre trombina. Più X si produce, più trombina si produce. A livello di scoagulazione l'emofilico sanguina perché gli manca quel complesso, quindi lui riesce a tappare immediatamente però dopo il sistema crolla. L'emofilico ha problematiche spesso e volentieri di ematomi.

DIVISIONI TRA ZIMOGENI E COFATTORI.

Zimogeno è chi deve attivare qualcun'altro. I cofattori non attivano nessuno ma accelerano l'attività di alcuni. Gli zimogeni per attivare qualcun'altro devono essere fermi perché la coagulazione avviene sempre appoggiata su qualcosa, quel qualcosa si chiama fosfolipidi. Avviene perché alcuni fattori si legano ai fosfolipidi. Si lega chi può legarsi. Per legarsi un fattore vi sono alcune proteine che hanno degli acidi glutammici nella porzione amino terminale che hanno una doppia carbossilazione, vitamina K. Quando sequenziarono le proteine il glutammato aveva un peso maggiore, c'era un gruppo carbossilico in più. Questi glutammati non erano messi a caso ma erano tutti concentrati in una porzione in numero variabile da 8 a 12. Negli anni trenta un premio nobel nel '43 fece una scoperta in Danimarca e si accorse che c'erano pazienti con coagulopatia associata a carenza di vitamina e lui negli anni '30 trovò questa vitamina. Fu chiamata K perché lui era danese quindi ceppo linguistico tedesco però sul versante anseatico dove coagulazione prende la stessa terminologia anglosassone ma si scrive con la K. Lui capì che la vitamina K era importante ma non sapeva perché. La carenza di vitamina K determinava coagulopatia.

Saranno molti anni dopo che si capirà che la vitamina K è un'amina della vita. Noi non la produciamo però è una delle poche amine della vita che abbiamo la capacità di tenere stretta. Abbiamo un sistema endogeno epatocitario che si basa sulla VKOR che è la ossidoreduttasi della vitamina K che è in grado di riciclare la vitamina K ossidata dalla gamma carbossilasi. Questa è una classica reazione biochimica in cui la gamma carbossilazione dell'acido glutammico prevede una ossido riduzione della vitamina K che è cofattore. Da questo punto di vista quindi la vitamina K viene recuperata da questa VKOR che la rende di nuovo disponibile. E guarda caso la VKOR è il

bersaglio molecolare di uno dei farmaci più diffusi che è il Warfarin. Da questo punto di vista quindi è chiaro che quelle proteine che hanno i residui gamma carbossilici si chiamano fattori vitamina K dipendenti perché la presenza di vitamina K ne determina la produzione. Il golgi capisce se la proteina non ha le modificazioni post trascrizionali e non la manda fuori. Quindi a livello plasmatico si noterà una riduzione di fattori vitamina K dipendenti se manca la vitamina K. Può mancare per due motivi :

1. uno non mangia sostanze che contengono vitamina K. La vitamina K è contenuta abbastanza diffusamente in quasi tutti gli alimenti con concentrazioni diverse ( rara nella carne, discretamente presente nel fegato bovino, nelle frattaglie, è particolarmente diffuso nelle verdure a foglia larga)
2. la VKOR o è bloccata farmacologicamente o di base non funziona. La VKOR può essere modificata dal punto di vista genetico quindi non funziona. Quindi è come essere in coumadin a vita e avere un PT allungato. Tutte queste proteine sono sintetizzate a livello epatico. Quindi in paziente con insufficienza epatica quel fegato produce meno anche di questi fattori. Un PT allungato è anche segno di insufficienza epatica.

Quali sono i fattori vitamina K dipendenti? Chi si lega: il VII deve legarsi a qualcuno per essere fermo; il IX ed il X perché essi stessi devono attivare qualcun’altro che è il II; il II perché deve attivare il I. I fattori vitamina K dipendenti sono : VII, IX, X, II. Gli altri no.

Chi sono i cofattori? Sono il V, l’VIII ed il fattore tissutale. Sono i tre cofattori centrali del sistema coagulativo che non sono vitamina K dipendenti.

---

FATTORI FAVORENTI TVP

Le cause che aumentano la probabilità di rischio nella trombosi venosa si dividono in due categorie: le acquisite e le ereditarie.

Cause acquisite (sono le più importanti ):

- la ridotta mobilità : il paziente geriatrico quasi sempre è in profilassi con eparina perché allettato per qualche mese aumenta il rischio di trombosi;
- età avanzata;
- neoplasie: causano soprattutto di tromboflebiti o trombosi degli arti superiori che sono atipiche. Cià è dovuto al fatto che c’è liberazione di citochine, di fattori angiogenetici e di fattori anche procoagulanti perché il tumore cresce, invade, costruisce vasi e avanza;
- chirurgia maggiore: in era per eparinica rischio di trombosi perché in questi interventi più si taglia più si libera fattore tissutale;
- traumi;
- gravidanza
    - primo perché in gravidanza si ha un assetto coaugulativo diverso. Non si devono utilizzare per la donna in gravidanza gli intervalli di riferimento fisiologici del

soggetto non in gravidanza perché dal secondo trimestre in poi dal punto di vista fisiologico aumentano i fattori procoagulanti e si riducono gli anticoagulanti perché si prepara al parto che è un evento emorragico acuto. Il parto porta emorragia perché l'utero è estremamente vascolarizzato. Durante il parto si possono perdere anche 2-3 g di emoglobina.
  - il secondo motivo è meccanico. Si immagini che dal secondo terzo trimestre questa massa cresce arrivando a 13-14 kg e pesa sulle cave. Infatti l' edema è un classico. Si ha un ingombro sterico.
  - contraccettivi orali : sono dibattuti, non c'è chiarezza;
  - terapia ormonale sostitutiva.

Fattori ereditari (che sono essi stessi tutti esami di laboratorio):

- deficit di antitrombina: Edberg 1965 scopre il deficit di antitrombina. Uno tra i più rari, circa 1 su 50000 casi a seconda delle casistiche. La diagnostica viene fatta esclusivamente con determinazione funzionale biochimica della proteina. Si va a vedere fisicamente la proteina. Non si fa biologia molecolare perché ci sono 215 mutazioni che colpiscono il gene dell'antitrombina. A livello clinico però non ha importanza. (parentesi sui test coagulativi: le raccomandazioni internazionali STH denunciano il fatto che non vanno mai eseguiti in acuto, cioè durante un evento trombotico acuto. Questo perché sono alterati dallo stesso evento cioè l'evento acuto li ha abbassati e non si sa quanto questo abbia inciso rispetto al fisiologico. Vanno sempre richiesti in un paziente dopo la terapia per andare a studiarlo dal punto di vista biochimico. Non vanno mai richiesti in acuto quelli in cui non vado a studiare il DNA ma la proteina funzionale);
- deficit proteina C: proteina vitamina K dipendente da 60 KD fatta da due subunità una da 40 e una da 21, con ponti disolfuro cisteina scoperta da Stenflo nel '78. Il primo deficit fu scoperto negli anni '80. Viene misurata dal punto di vista biochimico quindi si misura fisicamente la presenza proteica ma non si fa biologia molecolare perché ci sono più di 200 mutazioni;
- deficit proteina S: stesso discorso delle precedenti. Frequenze molto basse 0-0, 3 % a seconda delle casistiche (si parla di indoeuropei);

Questi tre sono i fattori di rischio più gravi ma anche i più rari.

Più del 50 % di TVP ancora oggi non hanno una eziopatogenesi chiara.

MUTAZIONE FATTORE V : Il più importante è questo. Nel 1993 ci fu una grande scoperta casuale di Dalbach che descrisse il primo caso di una famiglia affetta da una trombofilia ereditaria frequente nella popolazione del sud della Svezia, dove c'è Malmo, in un 3-5% in forma eterozigote. Scopre questa resistenza alla proteina C attivata che consiste in una mutazione. Lui descrisse il fenomeno biochimico. Fece un PTT aggiungendo della proteina C attivata e si accorse che, normalmente nei soggetti aggiungere proteina C attivata ad una PTT di fatto determinava un allungamento del tempo perché si aggiunge un anticoagulante e il sangue impiegherà più tempo a coagulare. Questa paziente ha avuto la fortuna di avere come medico Peter Svensson, che faceva dottorato di ricerca con Dalbach. Lui dichiarò che era una famiglia che si senti di mandare a casa

con terapia eparinica. Lui decise di andarla a studiare, fece l'albero genealogico. Capì che c'era ereditarietà e che era una famiglia trombofilica dovuta ad un meccanismo non precedentemente conosciuto di una bassa risposta anticoagulante alla proteina C. Dichiararono che c'era una predizione per un cofattore della proteina C. In realtà non c'era predizione. Loro hanno avuto il merito di scoprire questa resistenza ma non spiegarono il perché. Loro avevano scoperto un test di laboratorio capace di evidenziare una fenomeno di rischio trombofilico che però era presente elevato, nel 55%.

Successivamente l'olandese Bertina non cercò questo cofattore della proteina C ma una mutazione sul fattore V. Infatti cosa fa questa proteina C? Taglia il fattore V e VIII. Lui nel '94 cerco la mutazione sul fattore V perché era convinto di un problema di mutazione. La proteina C taglia il fattore V in tre posti :l'arginina al 306, 506, 679. Ma non taglia a caso, prima la 506 poi la 306 e per ultima la 679. Quando scoprirono che nella 506 non c'era un'arginina ma una valina trovarono la mutazione. Viene pubblicata questa mutazione come responsabile della resistenza alla proteina C attivata ed è presente nel 2-5 % nella popolazione indoeuropea. Fu chiamato fattore V di Leiden perché questi lavoravano a Leiden. Questo fattore è responsabile di circa il 90 % delle resistenze.

MUTAZIONE DEL FATTORE II DEL GENE DELLA PROTROMBINA che colpisce il nucleotide 20210 della zona non codificante intronica. E' in fondo sul gene ed è una regione di stop. La mutazione determina che la DNA polimerasi che non si ferma e quindi determina uno stato di iperprotrombineria. Scoperta sempre da Bertina nel '96.

Nella popolazione non si può parlare di screening della trombofilia, perché gli esami sono utilissimi ma su soggetti selezionati. Non si può esprimere in maniera predittiva su soggetti sani a rischio. Non esistono test con pochi falsi negativi.